

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ANANDA TISSIANEL DIAS

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL NA HIPERTENSÃO
EXPERIMENTAL RENOVASCULAR**

VITÓRIA

2014

ANANDA TISSIANEL DIAS

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL NA HIPERTENSÃO
EXPERIMENTAL RENOVASCULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Co-orientadora: Profa. Dra. Isabele Beserra Santos
Gomes

VITÓRIA

2014

ANANDA TISSIANEL DIAS

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL SOBRE A
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 04 de Abril de 2014.

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto

Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM)

Membro externo

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo

Universidade Federal do Espírito Santo - Membro interno

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profa. Dra. Ivanita Stefanon

Coordenadora PPGCF- UFES

VITÓRIA

2014

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, que mesmo sem entender muito bem o que eu fazia, ficava feliz por me ver estudando e nos seus lindos olhos o orgulho era visível.

À minha mãe, que eu amo tanto e que me ensina ser perseverante.

À vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS pela força e pela proteção que me concedeu nesse percurso. Com certeza, sem o cuidado Dele eu não teria chegado até o fim desta etapa.

Aos meu pais Antonio e Ana, que sempre estiveram ao meu lado. O amor e o carinho que eu recebo de vocês não tem preço e jamais me esquecerei.

Ao meu esposo Silas, que esteve sempre ao meu lado, o seu amor e a sua paciência foram essenciais.

Ao meu irmão Bruno e cunhada Camyla, que entenderam minhas ausências e sempre me escutaram nos momentos difíceis.

A todos meus familiares pelas orações e pela torcida.

Nessa caminhada, contei com muitas pessoas que marcaram minha vida, pelo jeito de ser e pelas lições que me ensinaram. Seria impossível falar de cada uma delas, porque posso correr o risco de deixar de citar o nome de alguém. Entretanto, pontuarei aqueles que foram mais próximos na produção deste trabalho.

Ao Professor Dr. Elisardo Corral Vasquez, mais que orientador, foi um amigo, proporcionando-me apoio e aconchego. Agradeço suas orientações, realizadas com muito carinho; por me ensinar a caminhar pelo conhecimento científico no decorrer da pesquisa.

À Professora Dra. Silvana dos Santos Meyrelles, por ter me recebido no laboratório, por sempre compartilhar opiniões, sugestões e ideias que contribuíram com o trabalho.

Aos Professores do mestrado, com os quais dividi muitos momentos de dúvidas, angústias e aprendizado no decorrer do curso, e que em muito contribuíram para o meu crescimento.

À Professora, doutora, amiga, parceira de todas as horas Camille Balarini, por me aceitar como estagiária, por me ensinar protocolos, por me incentivar e me encorajar em muitos momentos de dificuldade, a sua força e ensinamentos foram essenciais. A nossa participação em Congressos, além de muito enriquecedora, foi muito legal. Você é muito FERA!

Às Professoras e amigas Isabele Gomes e Ágata Gava, pela atenção, pela compreensão, pelos ensinamentos e pelas experiências compartilhadas.

À professora Ágata, que abdicou de suas férias e, com um barrigão “grávida de Miguel”, mediu a pressão dos animais.

Ao Professor Thiago de Melo, que desde a graduação foi uma fonte de inspiração e me mostrou o caminho para chegar até aqui.

À Professora Dra. Bianca Prandi Campagnaro, por seus ensinamentos e sua incontestável dedicação.

Às amigas Bianca Rodrigues, Marcella Porto e Flávia Freitas, que nos últimos tempos têm compartilhado muitas alegrias, felicidades, angústias e muito trabalho, vocês foram muito mais que colegas de trabalho.

Às alunas Amanda Cintra, Jéssica Frossard e Rossana Maiomi, pelo auxílio nos experimentos e pelos cuidados com os animais.

A todos os amigos do laboratório de Transgenes e de Controle Cardiovascular: Marcos, Sonila, Frederico, Gilberto, Thiago, Laís, Bernah. Viver e compartilhar todos esses dias com vocês tornou-os mais divertidos.

Com certeza esse trabalho foi desenvolvido com a colaboração de todos vocês.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar,
sem aprender a fazer o caminho caminhando,
sem aprender a refazer, a retocar o sonho
por causa do qual a gente se pôs a caminhar”.*

(PAULO FREIRE)

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial. A disfunção endotelial, o estresse oxidativo e o dano ao DNA é uma condição presente durante o desenvolvimento e manutenção da hipertensão renovascular induzida pela estenose da arterial renal no modelo 2R1C de Goldblatt. Estudos tem demonstrado que o sildenafil, inibidor da fosfodiesterase-5, aumenta a oferta do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) principal segundo mensageiro do óxido nítrico (NO), sendo capaz de melhorar a função endotelial, diminuir o estresse oxidativo e o dano ao DNA. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com sildenafil sobre a função vascular, o estresse oxidativo e a genotoxicidade em células de rim estenótico de camundongos hipertensos. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6, com aproximadamente 23 gramas, os animais foram separados em 3 grupos: Sham, 2R1C e 2R1C tratados com sildenafil (40mg/kg/dia). Os tratamentos foram iniciados 14 dias após a indução da hipertensão. Após 28 dias foram realizadas as medidas hemodinâmicas e em seguida os animais foram anestesiados. O leito vascular mesentérico (LMV) foi canulado e isolado para avaliação da função vascular por meio da construção de curvas dose-resposta à Acetilcolina (ACh) ou Nitroprussiato de sódio (NPS), após pré contração com norepinefrina. Os rins foram retirados e alguns foram armazenados em nitrogênio líquido para dosagem de angiotensina II (Ang II). Outros tiveram as células isoladas através de ação enzimática para a realização do ensaio do cometa para analisar a genotoxicidade, e análise do estresse oxidativo e produção de NO pela citometria de fluxo. As respostas vasodilatadoras estão expressas como percentual de relaxamento em relação à pré-contratação. A resposta máxima (R_{máx}) e o logaritmo negativo da concentração de droga que provocou metade da resposta máxima (pEC₅₀) foram calculados. Resultados de bloqueio farmacológicos foram expressos como a diferença na área abaixo da curva (dAUC). Os resultados estão expressos como média ± EPM. As comparações estatísticas foram feitas por ANOVA, seguida do *post hoc* de Bonferroni. *p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo sham; #p<0,05 e ###p<0,01 quando comparado ao 2R1C e &p<0,05 e &&p<0,01 quando comparado ao mesmo grupo sem bloqueio. O animais 2R1C apresentaram aumento da pressão arterial média (PAM) e da frequência

cardíaca (FC) (125 ± 2 mmHg e 516 ± 2 bpm, respectivamente) quando comparado ao grupo sham (PAM: 107 ± 2 mmHg e 451 ± 18 bpm) e o tratamento foi capaz de reduzir em 15% a PAM (112 ± 2 mmHg) nos animais 2R1C sildenafil assim como, reduzir a FC (471 ± 12 bpm). Os níveis teciduais de Angiotensina II nos animais 2R1C estavam aumentados ($179 \pm 32^* \mu\text{mol/g}$ tecido) quando comparados ao grupo sham ($70 \pm 7 \mu\text{mol/g}$ tecido) e o tratamento com sildenafil ($94 \pm 6 \mu\text{mol/g}$ tecido) foi capaz de reduzir em 50 % o níveis de Ang II. Os animais do grupo 2R1C demonstraram marcante disfunção endotelial ($R_{\text{máx}}: 48,7 \pm 1,8^{**}$) quando comparados aos controles ($R_{\text{máx}}: 76,13 \pm 2$), e o tratamento com sildenafil foi capaz de reverter essa disfunção ($R_{\text{máx}}: 67,48 \pm 4^{##}$). Tal disfunção não se deve à diminuição da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO, uma vez que não foram observadas diferenças nas respostas ao NPS. O papel do NO e das prostaciclina (PGI_2) foi verificado realizando o bloqueio com L-NAME e Indometacina e observamos que o relaxamento à ACh nos animais 2R1C estavam diminuídos (dAUC: NO: $51 \pm 5^*$; PGI_2 : $9,0 \pm 3,8^{\#}$ a.u.,) quando comparados aos controles (dAUC: NO: 77 ± 5 ; PGI_2 : $32,7 \pm 4,7$ a.u.) e foi restabelecido nos animais tratados (NO: $74 \pm 6^{\#}$; PGI_2 : $29,6 \pm 6,5^{\#}$ a.u.). Calculando a estimativa da participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) observamos que no grupo 2R1C havia menor participação deste fator no relaxamento quando comparado ao grupo sham e o grupo tratado com sildenafil. A inibição das espécies reativas de oxigênio (EROs), avaliada por meio do bloqueio da NADP(H) oxidase com apocinina possibilitou a observação de que as EROs apresentava maior influência no relaxamento dos animais 2R1C (dAUC: $76,0 \pm 4^*$ a.u.) quando comparada com o grupo sham ($48,7 \pm 5,9$ a.u.) e o grupo 2R1C sildenafil (dAUC: $56,8 \pm 5^{\#}$ a.u.). Na análise do estresse oxidativo do rim clipado realizado pela citometria de fluxo observamos que os animais 2R1C apresentaram aumento na produção de EROs ($\bullet\text{O}_2^-$: 887 ± 41 , H_2O_2 : 308 ± 22 a.u.) quando comparamos ao grupo sham ($\bullet\text{O}_2^-$: 700 ± 21 , H_2O_2 : $214 \pm 7,7$ a.u.) e o tratamento com sildenafil foi capaz de promover diminuição da produção de $\bullet\text{O}_2^-$ (765 ± 32 a.u.) e de H_2O_2 (235 ± 20 a.u.). Observamos que o tratamento com sildenafil aumentou em 1,7 vezes a produção de NO (350 ± 33 a.u.) no rim clipado quando comparado com o grupo sham e 2R1C (217 ± 10 , 260 ± 21 a.u., respectivamente). Na análise da genotoxicidade do rim clipado observamos que os animais 2R1C apresentaram um aumento nos parâmetros utilizados, como na porcentagem de DNA na cauda e no momento da

cauda ($38 \pm 5,7\%$, $52,2 \pm 10$ a.u.) quando comparados ao grupo sham ($21 \pm 2,1\%$, $21,5 \pm 3,2$ a.u.) e o sildenafil foi capaz de promover uma diminuição destes parâmetros ($17 \pm 3,4\%$, $17,3 \pm 3,5$ a.u.) diminuindo o dano ao DNA. Assim, estes dados evidenciam que o sildenafil promove uma melhora da disfunção endotelial que se observa na hipertensão renovascular por mecanismos que envolvem o aumento da biodisponibilidade de NO, aumento de PGI_2 e de EDHF e diminuição da produção de EROs. No rim, o qual tem participação na instalação da hipertensão e também, posteriormente, se torna alvo, os efeitos do sildenafil foram de redução do estresse oxidativo e o dano ao DNA das células do rim clipado, além de uma marcante redução dos níveis teciduais de angiotensina II, o que talvez explique o aumento na produção de NO.

Palavras-chave: Hipertensão renovascular, Sildenafil, Angiotensina II, Disfunção endotelial, Rim estenótico, Estresse oxidativo, Dano ao DNA.

ABSTRACT

Hypertension is a major worldwide health issue. The aim of the present study was to evaluate the beneficial effects of sildenafil on hemodynamics, endothelial function, and on oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidney in the mouse model of renovascular hypertension, type two-kidney, one clip (2K1C). Considering our previous report indicating that the chronic blockade of phosphodiesterase 5 with sildenafil (Viagra ®) has marked beneficial effects improve endothelial function and on oxidative stress and DNA damage in a model of spontaneous atherosclerosis, we tested the hypothesis that sildenafil could also reduce the endothelial dysfunction and protect the stenotic kidneys of 2K1C hypertensive mice against oxidative stress and DNA genotoxicity. This drug increases the bioavailability of the intracellular second messenger of NO (cGMP) by inhibition of phosphodiesterase 5. Male C57BL/6 mice were subjected to 2K1C hypertension. After 14 days, sildenafil (40 mg/kg/day) or vehicle was administrated, during a period of 14 days. At the end of experimental period, animals were anesthetized and catheterized for direct arterial pressure measurements. In the studies about endothelial function, the mesenteric arteriolar bed (MAB) was removed and studied its responsiveness through dose-response curves to acetylcholine (ACh) in vitro and precontracted with norepinephrine. The renal levels of angiotensin II in the stenotic kidneys were determined by a blind examiner in another laboratory. The stenotic kidney cells were isolated by enzymatic approaches for evaluation of cell viability and oxidative stress through flow cytometry and for evaluation of DNA damage through the comet assay. Measurements of intracellular superoxide anions and hydrogen peroxide levels as well as nitric oxide bioavailability were also obtained. Data are mean \pm SEM. The statistical analysis was through one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. 2K1C and $^{\&}p < 0,05$ e $^{\&\&}p < 0,01$ was considered as statistically significant. As expected, blood pressure and heart rate was higher in 2K1C than in sham mice (sham 107 ± 2 vs. 2K1C $125 \pm 2^*$ mmHg, 451 ± 18 vs. 516 ± 2 bpm, respectively). Sildenafil treatment significantly reduced mean arterial blood pressure ($112 \pm 2^*$ mmHg) and heart rate ($471 \pm 12^*$ bpm). The renal levels of angiotensin II showed elevation in 2K1C ($179 \pm 32^*$ pmol/g tissue) when compared to sham group (70 ± 7 pmol/g tissue). However, sildenafil prevented this elevation in the hypertensive

animals treated with this drug ($94 \pm 6^* \text{ pmol/g tissue}$). 2K1C mice showed markedly vascular dysfunction in the ACh test ($R_{\text{max}}: 48,7 \pm 1,8^{**}$) when compared to sham ($R_{\text{max}}: 76,13 \pm 2$), which was reversed by sildenafil treatment ($R_{\text{max}}: 67,48 \pm 4^{***}$). This dysfunction was not due to reduction in vascular smooth muscle sensitivity to NO, once no differences were found in SNP responses. The role of NO and COX-derived prostanoids (PGI_2) in relaxation of 2K1C was diminished ($\text{dAUC: NO: } 51 \pm 5^*$, $\text{PGI}_2: 9,0 \pm 3,8^\# \text{ a.u}$) when compared to sham ($\text{dAUC: NO: } 77 \pm 5$; $\text{PGI}_2: 32,7 \pm 4,7 \text{ a.u}$) but were restored by sildenafil ($\text{NO: } 74 \pm 6^\#$; $\text{PGI}_2: 29,6 \pm 6,5^\# \text{ a.u}$). The participation of ROS was evaluated by blockage of NAPH oxidase and it was observed that there was greater participation of ROS in 2K1C ($\text{dAUC: } 76,0 \pm 4^* \text{ a.u}$) when compared to sham and 2K1C sildenafil ($\text{dAUC } 48,7 \pm 5,9$, $56,8 \pm 5^\# \text{ a.u}$) and that sildenafil caused a significant reduction of oxidative stress. In stenotic kidney from 2K1C mice there was an increase in oxidative stress and reactive oxygen species production ($\bullet\text{O}_2^-: 887 \pm 41$, $\text{H}_2\text{O}_2: 308 \pm 22 \text{ a.u.}$) when compared to sham ($\bullet\text{O}_2^-: 700 \pm 21$, $\text{H}_2\text{O}_2: 214 \pm 7,7 \text{ a.u.}$), and sildenafil caused a remarkable decrease in these levels in treated animals ($\bullet\text{O}_2^-: 765 \pm 32$, $\text{H}_2\text{O}_2: 235 \pm 20 \text{ a.u.}$). On the other hand, sildenafil increased nitric oxide levels ($350 \pm 33 \text{ a.u.}$) relative to those in the nontreated 2K1C mice and sham (217 ± 10 , $260 \pm 21 \text{ a.u.}$, respectively). Similarly, treatment with sildenafil significantly reduced the high level of kidney DNA damage that is a characteristic of renovascular hypertensive mice. In stenotic kidney from 2K1C mice there was an increased DNA fragmentation (tail moment: $38 \pm 5,7\%$, % tail DNA: $52,2 \pm 10 \text{ a.u.}$) when compared to sham (tail moment: $21 \pm 2,1\%$, % tail DNA: $21,5 \pm 3,2 \text{ a.u.}$), and sildenafil caused a remarkable decrease in these parameters (tail moment: $17 \pm 3,4\%$, % tail DNA: $17,3 \pm 3,5 \text{ a.u.}$). Therefore, this study show revealed a beneficial cardiovascular effects, such as restoring endothelial function. Our data, suggest that the main mechanism of its action is restoring NO and PGI_2 and reducing the increased oxidative stress. In the stenotic kidneys of 2K1C mice sildenafil was able to reduce ROS production, increase NO bioavailability inhibit DNA damage and markedly reduced the levels de angiotensin II. Thus, these data contributes with important that for a future use of phosphodiesterase 5 inhibitors aiming the amelioration of endothelial function and renoprotection against the DNA damage in individuals with renovascular hypertension.

Keywords: Renovascular hypertension, Sildenafil, Angiotensin II, Endothelial dysfunction, Stenotic kidney, Oxidative stress, DNA damage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Efeitos da estenose arterial provocado pela implantação do clipe na artéria do rim esquerdo.....	27
Figura 2:	Esquema representativo do SRA.....	28
Figura 3:	Esquema representativo das possíveis vias bioquímicas para a síntese substâncias vasoativas pelo endotélio.....	30
Figura 4:	Representação esquemática da distribuição dos animais.....	41
Figura 5:	Representação esquemática dos protocolos realizados.....	41
Figura 6:	Demonstração da implantação do clipe na artéria renal do rim esquerdo.....	42
Figura 7:	Esquema representativo do sistema utilizado para realização do estudo da reatividade.....	46
Figura 8:	Ensaio do Cometa.....	53
Figura 9:	Gráfico da pressão arterial média.....	56
Figura 10:	Gráfico da frequência cardíaca.....	57
Figura 11:	Fotos típicas dos rins.....	58
Figura 12:	Gráfico dos níveis teciduais de Angiotensina II.....	59
Figura 13:	Relaxamento endotélio-dependente à acetilcolina do LVM.....	60
Figura 14:	Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio.....	62
Figura 15:	Participação dos prostanóides derivados da Ciclooxigenase no relaxamento dependente do endotélio.....	64
Figura 16:	Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio.....	66
Figura 17:	Importância da participação de cada uma das possíveis vias de disfunção endotelial.....	68
Figura 18:	Avaliação do estado funcional do músculo liso vascular.....	69
Figura 19:	A – Fotos representativas dos cometas típicos dos 3 diferentes grupos segundo o grau de dano no DNA. B- Gráfico representativo da porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda.....	70

Figura 20:	Representação dos histogramas e gráfico de barras obtidos da citometria de fluxo comparando a intensidade da fluorescência do DHE, DCF.....	73
Figura 21:	Representação dos histogramas e gráfico de barras obtidos da citometria de fluxo comparando a intensidade da fluorescência do DAF.....	74
Figura 22:	Esquema representativo da influência das EROs alteração da função das células.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Peso corporal e dos órgãos.....	58
Tabela 2:	Efeito do sildenafil na eficácia ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de Acetilcolina <i>in bolus</i> nos grupos 3 grupos estudados.....	60
Tabela 3:	Efeito do sildenafil na eficácia ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de Acetilcolina <i>in bolus</i> na ausência e presença de L-NAME e L-NAME+indometacina.....	63
Tabela 4:	Efeito do sildenafil na eficácia ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de Acetilcolina <i>in bolus</i> na ausência e presença de apocinina.....	65
Tabela 5	Valores da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de Nitroprussiato de sódio (NPS) <i>in bolus</i> nos 3 grupos estudados.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACH: Acetilcolina
Ang II: Angiotensina II
ANOVA: Análise de variância
APS: American Physiological Society
AT₁: Receptor de Angiotensina II tipo 1
AT₂: Receptor de Angiotensina II tipo 2
CEUA-EMESCAM: Comitê de Ética no Uso de Animais da EMESCAM
COX 1-2: Ciclooxygenase tipo 1 e tipo 2
CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
C57BL/6: linhagem de camundongo C57 black/6
dAUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva
DAF: Diaminofluoresceína
DCFH-DA:: Diacetato de diclorofluoresceína
DCV: Doenças cardiovasculares
DHE: Dihidroetídeo
DMSO: Dimetil sulfóxido
EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético
ECA: Enzima conversora de angiotensina
EETs: Ácido epoxieicosatrienóicos
EMESCAM: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
EPM: Erro padrão da média
EROS: Espécies reativas de oxigênio
FACS: Separador celular ativado por fluorescência
FC: Frequência cardíaca
GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HAS: Hipertensão arterial sistêmica
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
IRAP: Aminopeptidase reguladora de insulina
INDO: Indometacina

L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester

Log EC50: Log da concentração de agonista que produziu metade da resposta máxima

LVM: Leito vascular mesentérico

MIF: Mediana intensidade de fluorescência

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Nor: Norepinefrina

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NPS: Nitroprussiato de sódio

•O₂⁻: Ânion superóxido

PA: Pressão arterial

PAM: Pressão arterial média

PBS: Solução tampão fosfato (Salina tamponada com fosfato)

PDEs: Fosfodiesterases

PE50: Cânula de polietileno

PI: Iodeto de propídeo

PGI₂: Prostaciclina

PKGI: Proteína quinase I

R_{máx}: Resposta máxima

RPMI: Meio de cultura desenvolvido por Moore et al.

Sham: Animais submetidos a operação fictícia

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SRA: Sistema renina-angiotensina

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

SUS: Sistema Único de Saúde

Vigitel: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

2R1C: 2 Rins-1Clípe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Hipertensão.....	22
1.1.1 Epidemiologia.....	22
1.1.2 Hipertensão renovascular.....	24
1.1.3 Função endotelial e Hipertensão.....	28
1.1.4 Hipertensão e estresse oxidativo.....	31
1.2 Tratamento com sildenafil.....	33
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivos gerais.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Animais experimentais.....	40
4.2 Grupos experimentais.....	40
4.3 Protocolos experimentais.....	41
4.4 Indução da hipertensão renovascular 2R1C.....	41
4.5 Tratamento dos animais.....	43
4.6 Medidas hemodinâmicas.....	43
4.6.1 Cateterização da artéria carótida e medida da PA.....	43
4.7 Determinação dos parâmetros biológicos.....	44
4.7.1 Peso Corporal, peso dos rins e razão de peso do coração pelo comprimento da tíbia.....	44
4.8 Reatividade vascular do leito mesentérico.....	44
4.8.1 Reatividade vascular do LVM a ACh.....	46
4.8.2 Reatividade vascular do LVM a ACh na presença de bloqueadores farmacológicos.....	46
4.8.2.1 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio do LVM.....	46
4.8.2.2 Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxigenase (COX) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio no relaxamento dependente do endotélio do LVM.....	46
4.8.2.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio do LVM.....	47

4.8.2.4 Verificação das respostas obtidas na reatividade vascular.....	47
4.9 Determinação dos níveis de Angiotensina II do rim esquerdo.....	47
4.10 Isolamento das células do rim esquerdo.....	48
4.11 Análises pela Citometria de fluxo.....	49
4.11.1 Análise da Viabilidade celular.....	49
4.11.2 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio no rim esquerdo.....	49
4.11.3 Detecção de Óxido Nítrico intracelular.....	50
4.12 Ensaio do cometa alcalino.....	51
4.13 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Parâmetros hemodinâmicos	56
5.2 Avaliações do peso corporal final e dos órgãos	57
5.3 Níveis intrarenais de Angiotensina II.....	59
5.4 Reatividade vascular.....	59
5.4.1 Resposta do endotélio à ACh – Vasodilatador dependente do endotélio	60
5.4.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio.....	61
5.4.3 Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxigenase no relaxamento dependente do endotélio.....	63
5.4.4 Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio.....	65
5.4.5 Estimativa da participação do NO, dos prostanóides, EROs e EDHF no relaxamento dependente do endotélio.....	67
5.4.6 Resposta do músculo liso ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio.....	68
5.5 Avaliação dos níveis de fragmentação do DNA de células do rim clipado..	69
5.6 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio O ₂ e H ₂ O ₂ e detecção de NO nas células do rim clipado.....	72
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÃO.....	89

8 REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO I Publicação Resultante deste Trabalho.....	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO

1.1.1 Epidemiologia

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e mantidos da pressão arterial (PA). Associa-se, frequentemente, às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, como por exemplo, coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos; e também às alterações metabólicas, que aumentam o risco de disfunções cardiovasculares fatais e não fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Em uma década, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à HAS (54% por acidente vascular encefálico e 47% por doença isquêmica do coração), sendo que a maioria dos óbitos ocorreram em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos (WILLIAMS, 2008). Constata-se assim que a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial (PA) a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (LEWINGTON *et al.*, 2002).

A HAS é um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, uma vez que aproximadamente 32% dos adultos brasileiros sofrem de hipertensão arterial, sendo que mais de 50% dos indivíduos com idade entre 60 a 69 anos e 75% dos idosos com mais de 70 anos são hipertensos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). De acordo com a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – Vigitel 2012, especificamente no município de Vitória-ES, 24,7% da população se declara hipertensa, sendo a doença mais comum entre as mulheres (26,5%) do que entre os homens (22,5%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Estes valores subestimam os dados obtidos no projeto Monica, que foi desenvolvido neste programa de pós-graduação pelo Prof. Dr. José Gerado Mill. Pois o percentual de indivíduos classificados como hipertensos alcançou níveis elevados e a prevalência de hipertensão na população de Vitória foi 37,8%.

As DCV são ainda responsáveis pela alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados. Em relação aos custos, em novembro de 2009, houve 91.970 internações, resultando em um custo de R\$165.461.644,33 (DATASUS, 2009). A doença renal terminal, outra condição frequente na HAS, ocasionou a inclusão de 94.282 indivíduos em programa de diálise no Sistema Único de Saúde (SUS), registrando-se 9.486 óbitos em 2007. Em 2012, o SUS registrou 115.748 internações devido às complicações decorrentes da hipertensão (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2010).

A HAS é causa direta de cardiopatia hipertensiva e isquêmica e é fator de risco para doenças decorrentes de aterosclerose e de trombose, que se manifestam, predominantemente, por doença isquêmica cardíaca, cerebrovascular, vascular periférica e renal. Além de ser fator etiológico de insuficiência cardíaca, déficits cognitivos, como doença de Alzheimer e demência vascular. Essa multiplicidade de consequências coloca a HAS na origem de muitas doenças crônicas não transmissíveis e, portanto, caracteriza-se como uma das causas de maior redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (DUNCAN; SCHMIDT; GIUGLIANI, 2006).

Apesar dos esforços para desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial, sua causa permanece desconhecida em aproximadamente 95% dos pacientes, caracterizando a hipertensão primária ou essencial. O desenvolvimento da doença implica ainda em outros fatores, como a ativação do sistema nervoso simpático, o *upregulation* do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O estresse oxidativo é um fator envolvido em todos esses processos e pode ser decorrente do excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), da diminuição na produção de óxido nítrico (NO) ou da redução das vias antioxidantes nos sistemas cardiovascular e renal (MONTEZANO; TOUYZ, 2012).

1.1.2 Hipertensão renovascular

A hipertensão é uma das principais causas de doenças cardiovasculares, sendo responsável por um grande número de mortes prematuras. Nos Estados Unidos, aproximadamente 75 milhões de adultos são hipertensos, dos quais

aproximadamente 5% ocasionados por hipertensão renovascular, que ocorre devido a uma importante oclusão da artéria renal. A hipertensão renovascular é uma condição secundária gerada pela estenose da artéria renal ou pode estar associada a doenças ateroscleróticas (KHANGURA *et al.*, 2013). É muito comum o aumento da pressão arterial sanguínea em pacientes com doença renal crônica e com hipertensão renovascular, sendo esta considerada como hipertensão secundária e normalmente os pacientes são resistentes a tratamentos farmacológicos (CAMPAGNARO *et al.*, 2013).

O modelo experimental 2 Rins-1Clipe (2R1C) é um modelo clássico de hipertensão renovascular que foi desenvolvido por Goldblatt e colaboradores em 1934. Vários estudos já foram realizados em nosso laboratório utilizando esse modelo de hipertensão (ARRUDA *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2012; CAMPAGNARO *et al.*, 2013). Em animais experimentais, esse modelo é dependente da ativação contínua do SRA. O tempo de manutenção da pressão elevada e os níveis pressóricos atingidos no modelo 2R1C dependem da espécie e do grau de estenose da artéria renal (LERMAN *et al.*, 2005). Estudos realizados por Wiesel e cols. (1997) mostraram que a concentração da renina plasmática e a expressão do RNAm para renina estavam aumentados 4 semanas após a clipagem da artéria renal de camundongos C57BL/6, além disso verificaram a importância do tamanho da abertura do clipe para que de fato promova a hipertensão.

A estenose unilateral da artéria renal promove uma redução da perfusão sanguínea no rim clipado, promovendo um aumento de aproximadamente 3 vezes dos níveis circulantes de renina, que é secretada pelas células justaglomerulares, que funcionam como mecanorreceptores e são encontradas principalmente na parede das arteríolas aferentes. Existem 3 estímulos para a secreção de renina: a estimulação simpática, a diminuição da tensão vascular na arteríola aferente renal e redução da carga filtrada de sódio que alcança a mácula densa; todos esses estímulos estão presentes durante quedas da PA. A renina liberada para a circulação age sobre o angiotensinogênio, uma α -globulina sintetizada pelo fígado e abundante no plasma, clivando uma sequência de 10 aminoácidos; a angiotensina I, que por sua vez é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando

um octapeptídeo, a angiotensina II (Ang II), o hormônio responsável pelas principais ações do SRA na PA (AIRES, 2007).

Há aproximadamente 115 anos, Tigerstedt e Bergman descobriram o papel da enzima renina, tornando, até os dias de hoje, o sistema renina-angiotensina (SRA) motivo de muitas pesquisas realizadas. Sabe-se que no SRA clássico temos o envolvimento da renina, da enzima conversora de angiotensina (ECA), que é responsável pela síntese de Ang II, e do receptor AT_1 , que tem um importante papel fisiológico na regulação cardiovascular, na função renal, na pressão sanguínea, na biossíntese de aldosterona e no balanço de sal e água do organismo (ZHUO *et al.*, 2013).

A Ang II é um hormônio que possui efeitos pleiotrópicos em diversos tecidos, incluindo o rim, os vasos sanguíneos e o sistema nervoso. Apesar de seus efeitos fisiológicos, quando o SRAA está ativado de maneira exacerbada, pode causar efeitos deletérios nos rins e contribuir para uma perda progressiva da função renal. A ativação continuada do SRAA é capaz de promover constrição das arteríolas renais, levando ao aumento da resistência vascular periférica ou renal, aumento da pressão dos capilares glomerulares, quadros de proteinúria e ao aumento do estresse oxidativo, via ativação da NADP(H) oxidase. O que gera uma disfunção endotelial, promovendo proliferação das células mesangiais e desencadeando processos inflamatórios e o desenvolvimento de processos prófibroticos (ROSCIONI; HEERSPINK; de ZEEUW, 2013).

As ações da Ang II em receptores AT_1 podem causar múltiplos efeitos no sistema cardiovascular e renal, como por exemplo: vasoconstrição arterial sistêmica, estimulação da reabsorção de água e sódio pelo túbulo renal, e aumento da secreção de aldosterona pela glândula adrenal. Em receptores AT_2 , as ações da Ang II ainda não estão bem definidas, sabendo-se apenas que, nos rins, promove aumento da resistência da arteríola aferente, preserva a taxa de filtração glomerular e provoca uma diminuição da perfusão renal. A Ang II, também pode estimular a produção das prostaglandinas, prevenindo uma vasoconstrição excessiva da circulação sistêmica ou renal (VALLOTTON *et al.*, 1989; SAYER; BHAT, 2014).

Nos animais submetidos ao modelo de hipertensão 2R1C, o desenvolvimento da hipertensão é acompanhado por significativo aumento nos níveis de Angiotensina II (Ang II) intrarenal, tanto no rim clipado quanto no rim não clipado. Estudos têm demonstrado que aumentos na concentração plasmática de Ang II são capazes de induzir aumentos substanciais, que excedem os níveis plasmáticos, da Ang II intrarenal via receptor AT_1 . Este aumento pode persistir mesmo após a redução dos níveis plasmáticos de Ang II (NAVAR, *et al.*, 2002). O rim contralateral (não isquêmico) apresenta aumento na produção de RNAm para angiotensinogênio, aumento na atividade da enzima conversora de angiotensina II (ECA) intrarenal com aumento ou manutenção da produção local de Ang II intrarenal (NAVAR *et al.*, 2002). Independentemente da produção da ECA intrarenal, a produção de Ang II no rim clipado parece estar aumentada por via independente de renina, mas sim por via da quimase (HIYOSHI *et al.*, 2005; SADJADI *et al.*, 2005). O SRA tecidual “órgão-específico” atua de maneira independente do sistema SRA plasmático. Tem-se observado que o SRA circulante é responsável por processos agudos, enquanto a ativação do SRA tecidual está envolvida na resposta de um processo crônico, como um remodelamento estrutural secundário ao sistema cardiovascular (WANG; ZHANG; LIU, 2013). Na figura 1 podemos observar de maneira simplificada o que ocorre quando é gerada a estenose de uma artéria renal.

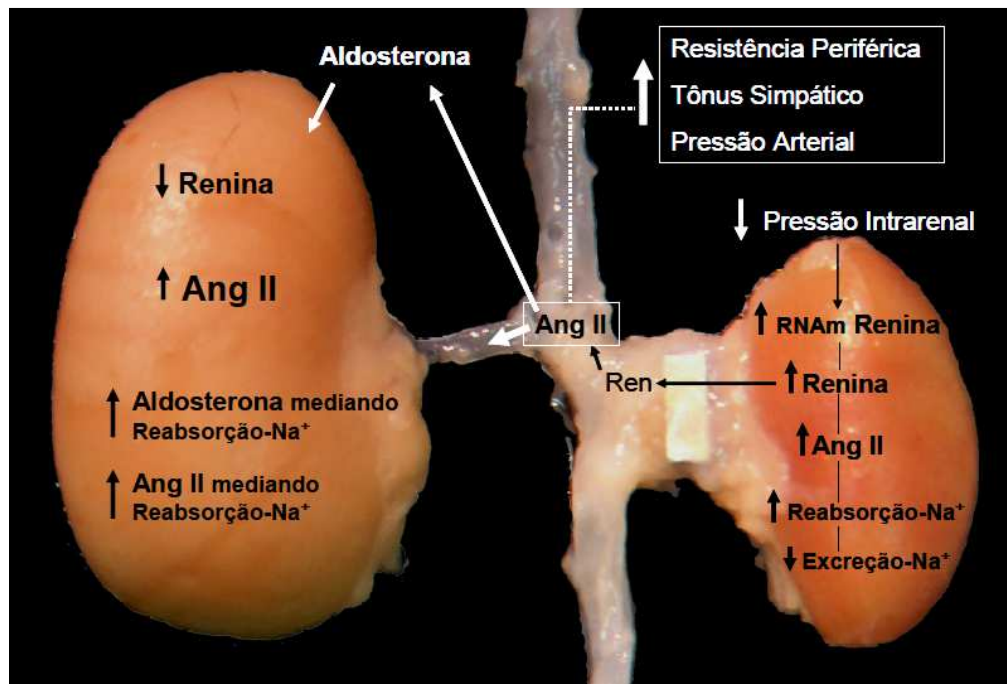


Figura 1: Efeitos da estenose arterial provocado pela implantação do clipe na artéria renal do rim esquerdo. Fonte: Nogueira, 2008.

A hipertensão renovascular está associada com o aumento da atividade do SRA e com a elevação da pressão sanguínea. No modelo de hipertensão 2R1C, o desenvolvimento de inflamação e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) no rim clipado é marcante, podendo levar a uma progressiva fibrose renal (MATAVELLI, 2011). Existem várias características em comum observadas entre a hipertensão renovascular em humanos e o modelo de hipertensão 2R1C, uma vez que uma maior ativação do SRA exerce um papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão.

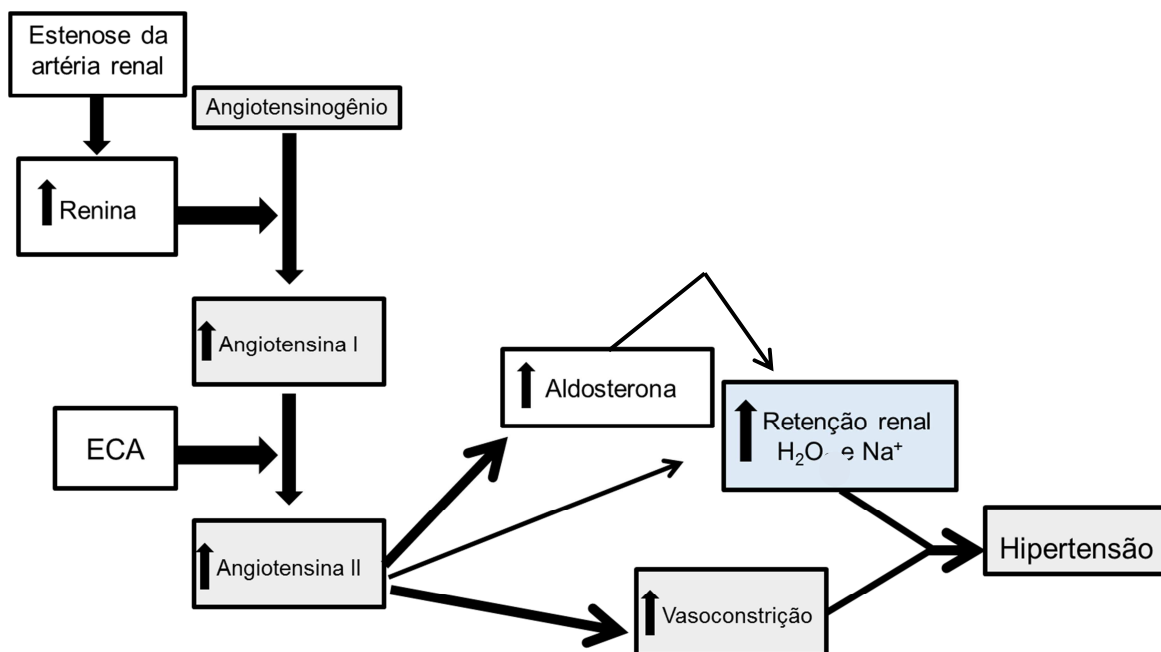


Figura 2: Esquema representativo do SRA. Fonte: HOLLENBERG *et al.*, 1990.

Apesar de muitos anos de estudo, o mecanismo do SRA, até dias de hoje, vem proporcionando aos pesquisadores novas descobertas, como por exemplo, a participação de novas enzimas e de outros receptores atuantes nesse sistema. Dessa forma, torna-se necessário novas pesquisas para elucidação dos mecanismos envolvidos na transdução de sinais. O mecanismo clássico é conhecido pela participação da renina/ECA/AngII/receptor AT_1 e AT_2 , não sendo exclusivo na via de sinalização do sistema. Três novas vias foram recentemente descritas como a ECA2/ Ang 1-7/ receptor MAS, a prorenina-PRR- Map quinases ERK1/2, assim como Ang IV/ AT_4 /IRAP (aminopeptidase reguladora de insulina).

1.1.3 Função endotelial e Hipertensão

O endotélio recobre todos os vasos do organismo, desde o coração, grandes, médias, pequenas artérias, microartérias e capilares, bem como toda a árvore venosa, veias pós capilares, pequenas, médias e grandes veias que conduzem o sangue de volta ao coração e os vasos linfáticos. O conhecimento sobre a função da célula endotelial se deu em 1980 através de estudos realizados por Furchgott e Zawadzki. Anteriormente a camada de células endoteliais era conhecida apenas

como uma barreira física entre as células sanguíneas e o músculo. A célula endotelial é capaz, através de extensa rede de transmissão de dados, de detectar a mínima alteração na pressão arterial, fluxo sanguíneo, balanço oxidativo (equilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes), coagulação, sinal de inflamação e ativação do sistema imune no organismo (Luz, *et al.*, 2005).

O endotélio vascular é um tecido capaz de controlar importantes funções nos vasos, incluindo a regulação do tônus vascular, homeostasia local, processos proliferativos, e manutenção da circulação sanguínea, fluidez, coagulação, e resposta inflamatória e imune (AVERSA, 2008). A regulação do tônus e da estrutura de vasos de condutância e de resistência acontece por meio da liberação contínua de vários mediadores vasoativos, com ações parácrinas e autócrinas como o óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs), endotelina-1 (ET-1), Angiotensina II (Ang II), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI₂) e ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) (MEYRELLES, *et al.*, 2011).

O NO derivado do endotélio possui ações parácrinas, pois tem importante participação no controle do tônus vascular, inibe a agregação plaquetária, previne a adesão de leucócitos e reduz a proliferação de células da camada íntima (ZHANG *et al.*, 2014). O relaxamento normal do vaso é dependente de vários vasodilatadores como NO, os derivados das prostaglandinas (PGI₂) e dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (GILES *et al.*, 2012).

Como demonstrado na figura 3, o *shear stress*, a acetilcolina, e agonistas como a bradicinina, trombina e serotonina quando se ligam a receptores específicos nas células endoteliais são capazes de promover um aumento da concentração dos níveis de Ca²⁺ intracelular. O aumento intracelular de Ca²⁺ ativará a óxido nítrico sintase (eNOS), que a partir do aminoácido L-arginina produzirá NO, sendo necessário alguns cofatores como tetrahidrobiopterina (BH₄), NADPH, e a presença de oxigênio molecular. O NO produzido pelas células endoteliais se difunde para as células do músculo liso, ativando a guanilato ciclase solúvel que produzirá GMPc a partir de GTP, e induzirá uma diminuição do Ca²⁺ e consequentemente relaxamento das células musculares lisas (MEYRELLES, *et al.*, 2011).

É bem estabelecido que a disfunção endotelial vascular está envolvida na fisiopatologia das DCV, incluindo a hipertensão e aterosclerose. A disfunção endotelial pode ser definida como um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e fatores constritores, pró e anticoagulantes ou inibidores ou promotores de crescimento. A reação catalisada pela eNOS também é responsável pela produção de EROs, incluindo radicais livres como ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peroxinitrito ($\bullet\text{ONOO}^-$), radicais hidroxila (OH^\bullet) e não radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que estão envolvidas em diversas DCV (TOUYZ *et al.*, 2011; MEYRELLES *et al.*, 2011).

A HAS compromete dois componentes vasculares importantes: a estrutura vascular e a função vascular. A elevação da pressão arterial determina modificações nas propriedades mecânicas das artérias, promovendo o aumento da rigidez vascular. Estas modificações envolvem o aumento na deposição de matriz extracelular, como colágeno e integrinas; e aumento na atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001). Por outro lado a hipertensão leva ao prejuízo na função vascular, refletida, principalmente, pela diminuição dos vasodilatadores, onde destacamos o papel do óxido nítrico.

O NO é um radical livre, volátil e com tempo de meia vida curto e assim que é liberado pelo endotélio, difunde-se para o lado luminal do vaso, onde inibe a adesão e agregação plaquetária, aumentando a fluidez do sangue e prevenindo a trombose. O NO também se difunde para a região subendotelial, onde induz a dilatação do músculo liso vascular e inibe o remodelamento e a proliferação de células musculares lisas (MITCHELL *et al.*, 2008).

1.1.4 Hipertensão e estresse oxidativo

Estudos recentes têm sugerido um papel do estresse oxidativo na estrutura e na função das artérias. Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem levar ao aumento de resistência das artérias, pois diminuem a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) por peroxidação de lipídeos de membrana, causando prejuízo no relaxamento e promovendo a proliferação de células do músculo liso. A elevação da pressão arterial sanguínea, causada por aumento de

Ang II, xantina oxidase ou por estresse mecânico, também pode levar a um aumento da produção de EROs, capaz de promover um prejuízo da função endotelial (KLIMA *et al.*, 2013).

A participação das EROs derivadas do aumento dos níveis de Ang II, entre outros efeitos, causam prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, alterações nas respostas contráteis, além de remodelamento vascular observado na hipertensão. A enzima NADP(H) oxidase é uma das principais fontes de ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) nos vasos sanguíneos. Na hipertensão ou em situações em que ocorre exposição a Ang II ocorre um aumento da atividade da NADP(H) oxidase e também da expressão de suas subunidades, embora outros sistemas, como a xantina oxidase, também desempenhem um importante papel. (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

Estudos tem demonstrado o papel da Ang II no desenvolvimento do estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos e em ratos com hipertensão renovascular. Sabe-se que as EROs têm fundamental importância para ativação do sistema renina-angiotensina. Além disso, estudos experimentais realizados em animais têm demonstrado que o aumento de EROs, particularmente $\bullet\text{O}_2^-$, pode interagir com o DNA, podendo resultar em dano oxidativo e aumento da fragmentação do DNA, mediada pela injúria renal (CAMPAGNARO *et al.*, 2013).

A principal responsável pela produção de $\bullet\text{O}_2^-$ nas células do sistema cardiovascular é a NADP(H) oxidase que possui subunidades citosólicas (p47phox, p67phox, ou homólogos) e subunidades de membrana (NOX-1/NOX-2/NOX-4/NOX-5 e p22phox), que, após serem ativadas, formam um complexo enzimático funcional. No entanto, os resultados sobre o papel específico da isoforma NOX nas alterações vasculares presentes na hipertensão são controversos e, além disso, sabemos que a mitocôndria também é uma fonte de EROs na hipertensão arterial. A ativação da NADP(H) oxidase, induzida por Ang II, induz a síntese de EROs pela mitocôndria, aumentando ainda mais a produção de $\bullet\text{O}_2^-$ e alterando a resposta vascular. Portanto, pode-se correlacionar o importante papel dessas duas fontes de EROs nos vasos sanguíneos. Em diferentes modelos de hipertensão em animais e também em humanos hipertensos observaram-se que as EROs e os prostanoídes derivados da

ciclooxigenase 1 e 2 são mediadores importantes responsáveis pela disfunção endotelial (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

A Ang II induz uma maior expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), aumentando a produção de prostanóides em células vasculares, como no endotélio, nas células do músculo liso, na camada adventícia e nos fibroblastos. Sugere-se que o estresse oxidativo induz um aumento da atividade da COX por promover um *upregulation* na expressão da COX-2. Essa está particularmente aumentada na hipertensão. Tanto a Ang II quanto a COX-2 estão associadas com a inflamação e remodelamento vascular. Entretanto, sabemos que a COX-2 apresenta um papel importante nas ações mediadas pela Ang II, ocasionando problemas vasculares. Alterações na função das células endoteliais também contribuem para inflamação vascular (WONG *et al.*, 2011).

1.2 Tratamento com sildenafil

A atividade biológica do NO tem sido extensivamente estudada desde sua descoberta. Uma característica importante do endotélio vascular é a saída adequada desta molécula para haver produção de um importante segundo mensageiro no músculo liso, o GMPc, que por sua vez promove vasodilatação. A produção do NO ocorre devido a hidrólise da L-arginina na presença de oxigênio molecular e de vários cofatores, que resultam na produção de NO e L-citrulina. O radical NO, poderá atuar de maneira autócrina ou parácrina, permeando as membranas ou reagindo com outras moléculas que possuem elétrons desemparelhados, desde grupos tióis e heme ferro. Os efeitos do NO, são dependentes da sua concentração. Seu efeito protetor e vasorelaxante são obtidos quando está presente em pequenas concentrações (picomolar ou nanomolar), quando encontra-se em altas concentrações está associado a efeitos citotóxicos (MILLER; MEGSON, 2007; VERAS *et al.*, 2013).

A via de sinalização NO/GMPc tem importante papel no relaxamento vascular e na regulação da pressão sanguínea. Fatores genéticos ou uma inibição farmacológica dessa cascata pode levar a uma diminuição do relaxamento e aumento da pressão sanguínea. No músculo liso vascular, o relaxamento é mediado

pelo segundo mensageiro GMPc, esse é dependente da proteína kinase I (PKGI). Os efeitos/concentração do GMPc são controlados pelas fosfodiesterases (PDEs), que possuem várias isoformas, sendo que a PDE 1 e a PDE 5 possuem maior afinidade pelo GMPc e são responsáveis por sua degradação no músculo liso (STEGBAUER *et al.*, 2013).

A PDE 1 é estimulada pela presença de Ca^{2+} /calmodulina, tem-se verificado que ela possui um importante papel quando há um aumento na concentração de Ca^{2+} e na presença de vasoconstritores. Em situações de baixas concentrações de Ca^{2+} a PDE 5 é considerada como maior responsável pela degradação do GMPc. É amplamente aceito que a via NO/GMPc neutraliza a vasoconstrição induzida pelo sistema renina angiotensina, mantendo a homeostasia circulatória (STEGBAUER *et al.*, 2013), ativando mecanismos antioxidantes, além de reduzir as concentrações teciduais de EROs e aumentar a biodisponibilidade de NO, evitando que EROs possa reagir com o NO diminuindo sua biodisponibilidade.

O sildenafil tem sido amplamente utilizado para tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar. Essa droga aumenta a biodisponibilidade intracelular do segundo mensageiro NO/GMPc através da inibição da PDE 5. Tem sido relatado que o sildenafil é capaz de promover melhora da função endotelial em condições de doença arterial coronariana, assim como no diabetes sendo capaz de reduzir o estresse oxidativo em vários tecidos (MILANI *et al.*, 2005; PATIL; SINGH; KULKARNI, 2006; AVERSA *et al.*, 2008). Estudos recentes em nosso laboratório mostraram que o tratamento com sildenafil foi capaz de promover melhora da função endotelial e diminuir o dano ao DNA de animais ateroscleróticos (BALARINI *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Diante de vários danos provocados pela hipertensão e de sua alta incidência na população, a proposta do nosso trabalho foi investigar qual o efeito do tratamento com sildenafil na função endotelial e na pressão arterial de camundongos com hipertensão renovascular, assim como avaliar se o tratamento seria capaz de diminuir o estresse oxidativo e consequentemente reduzir o dano no DNA do rim submetido a estenose arterial.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial e está associada às alterações funcionais e estruturais dos órgãos-alvo, como por exemplo, coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos; e também às alterações metabólicas, que aumentam o risco de disfunções cardiovasculares. As DCV são responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados. Essa multiplicidade de consequências coloca a HAS como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, caracterizando-se como uma importante causa de redução da expectativa e da qualidade de vida das pessoas. Aproximadamente 5% dos pacientes hipertensos são caracterizados por possuírem hipertensão secundária que é causada pela estenose da artéria renal.

O fato de os mecanismos fisiopatológicos presentes na hipertensão renovascular envolverem disfunção endotelial, estresse oxidativo, dano ao DNA e uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, associado às evidências de que a inibição farmacológica da PDE5, aumenta a disponibilidade de GMPc, melhorando os efeitos causados pela hipertensão, promove o tratamento com sildenafil como uma estratégia extremamente promissora no combate às doenças cardiovasculares.

Portanto, fazem-se necessários estudos que avaliem tratamentos capazes de promover uma diminuição dos efeitos causados pela hipertensão. Estes associados a medicamentos já existentes no mercado comercial para outras finalidades tornam-se de grande relevância.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar em camundongos com hipertensão renovascular os efeitos do tratamento crônico com sildenafil sobre a função vascular e a genotoxicidade em células de rim submetidos à estenose arterial.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar o efeito do tratamento sobre os parâmetros ponderais;
- Verificar o efeito do tratamento sobre a PAM e FC;
- Verificar o efeito do tratamento sobre os níveis de Ang II intrarenal;
- Avaliar a reatividade vascular do LVM e a sensibilidade à acetilcolina;
- Estudar a participação do NO, dos derivados da COX, do EDHF e das EROs na função vascular *in vitro* nos grupos experimentais;
- Verificar o estresse oxidativo pela produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, e a biodisponibilidade de NO pelo rim clipado;
- Avaliar se o tratamento com sildenafil reduz o dano oxidativo ao DNA;

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6 (C57), com peso corporal entre 22,8 e 23,2g com aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais foram criados pelo biotério do Laboratório de Transgenes de Controle Cardiovascular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. O uso e cuidado destes animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e da *American Physiological Society* (APS). Os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA-EMESCAM Protocolo nº 02/2013).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais colocadas em estantes climatizadas (Alesco, São Paulo, Brasil) onde receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como a temperatura (22 2°C) e a umidade (70%) do ambiente.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos experimentais:

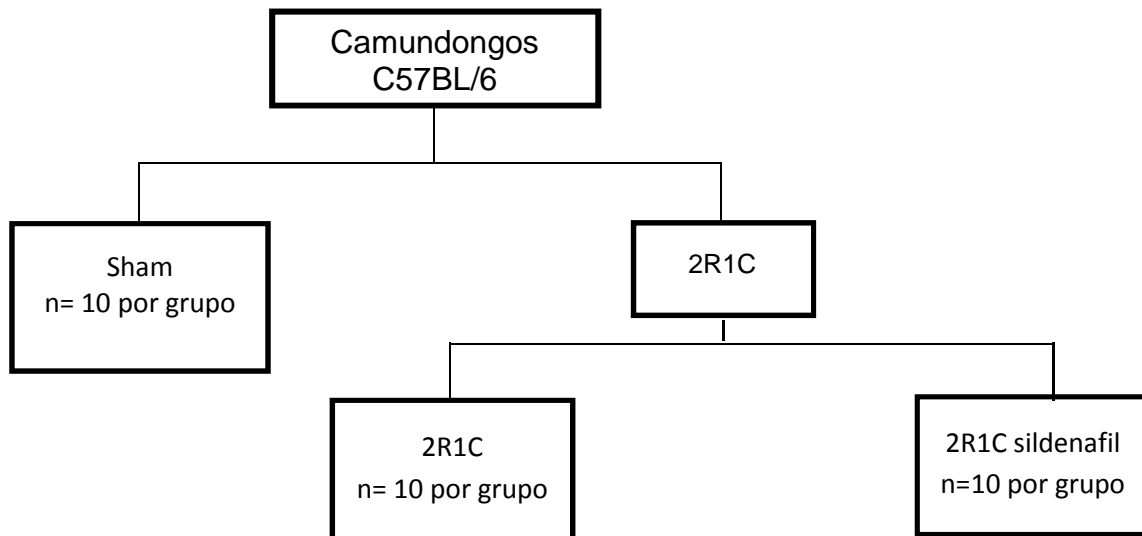


Figura 4: Representação esquemática da distribuição dos animais.

4.3 Protocolos experimentais

Os experimentos foram realizados de acordo o cronograma apresentado:

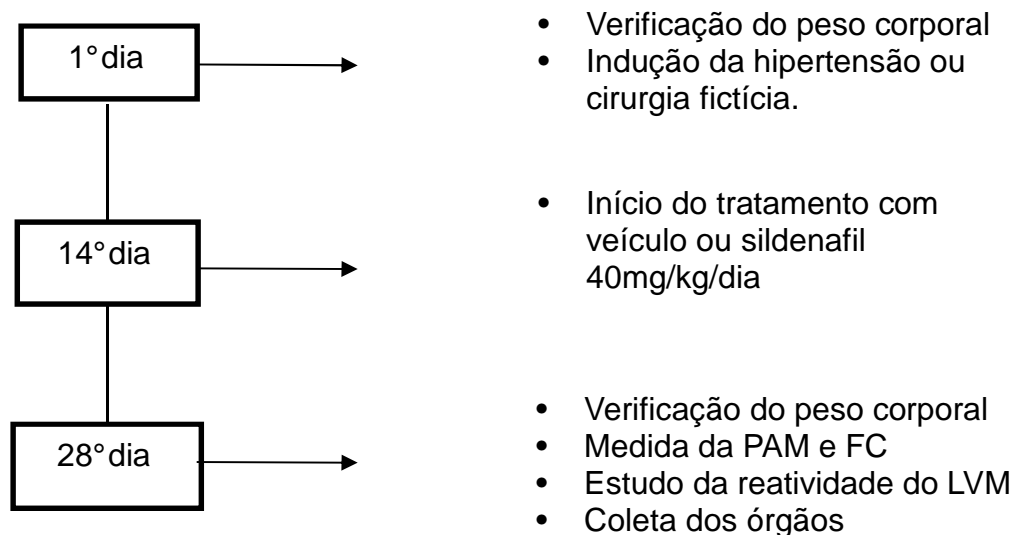
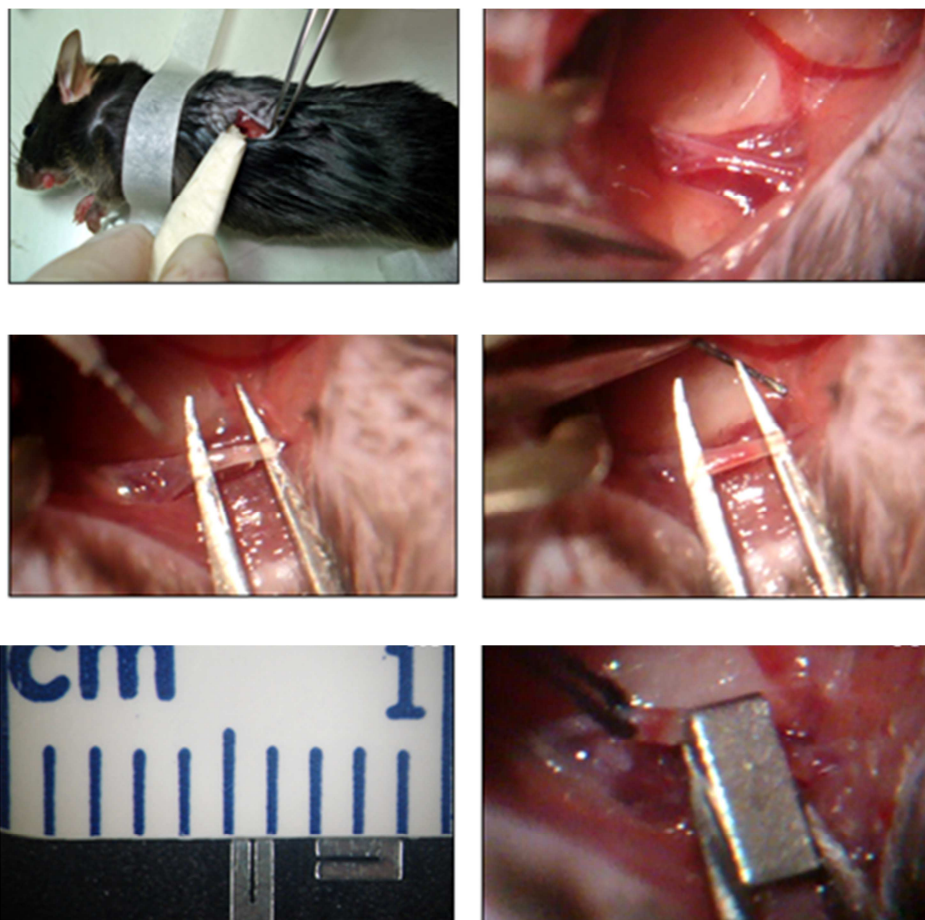


Figura 5: Representação esquemática dos protocolos realizados

4.4 Indução da hipertensão renovascular 2R1C

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9,1 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a tricotomia, foi realizada uma incisão no flanco esquerdo dos animais para exposição do conteúdo da cavidade retroperitoneal. Com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica SA, modelo SM 2002, Belo Horizonte, MG, Brasil), a artéria renal esquerda foi isolada cuidadosamente da veia renal e um clipe de aço em forma de “U” com 0,12mm de abertura (Exidel AS, Moutiter, Suíça) foi implantado ao redor da artéria renal esquerda, próximo à aorta dos grupos 2R1C, provocando uma diminuição do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, redução da pressão de perfusão renal, levando a uma estenose arterial semelhante àquela observada em humanos com hipertensão renovascular. Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe. Estes animais foram estudados 28 dias após a cirurgia.



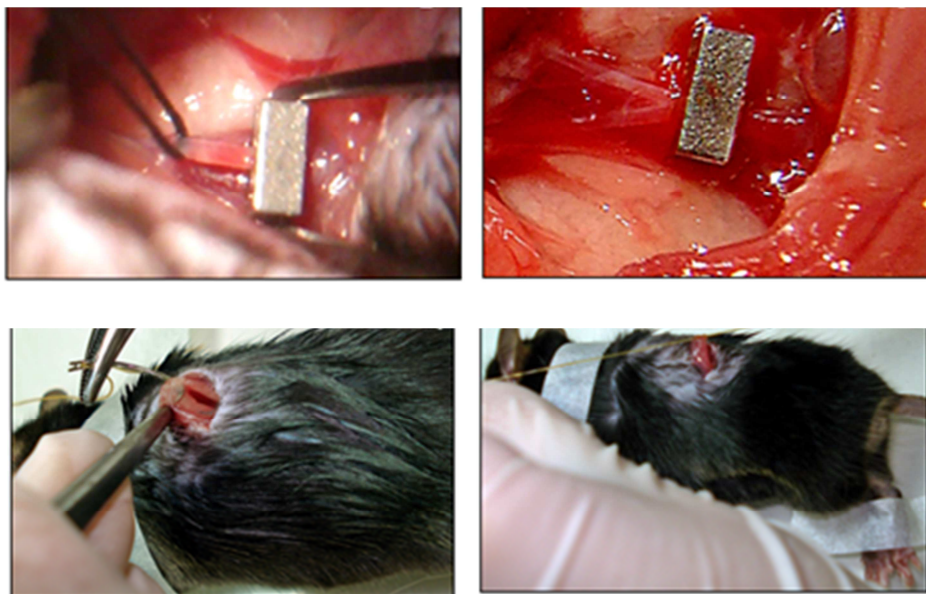


Figura 6: Demonstração da implantação do clipe na artéria renal do rim esquerdo. Fonte: Campagnaro, 2012.

4.5 Tratamento dos animais

O tratamento com veículo (água) ou sildenafil foi iniciado 14 dias após a indução da hipertensão renovascular e tiveram a duração de 14 dias. Foi usado sildenafil (Pfizer, São Paulo, Brasil) na dose de 40 mg/kg/dia. A dose foi escolhida por se aproximar dos valores utilizados na prática clínica para o tratamento de hipertensão pulmonar em humanos (DUSSAULT *et al.*, 2009). Os animais sham e 2R1C veículo receberam apenas o veículo (100 µL de água) por igual período de tempo. Todos os tratamentos foram realizados por via oral (gavagem), sempre pelo mesmo administrador.

4.6 Medidas hemodinâmicas

4.6.1 Cateterização da artéria carótida e medida da PA

Para a medida da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) 26 dias após a cirurgia, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina 91,0/9,1 mg/kg por via intraperitoneal para a introdução de um cateter na artéria

carótida direita comum, que consistia em uma cânula com 4 a 5 cm de comprimento (0,040 mmOD X 0,025 mm ID; Micro-Renathane; Braintree Science, USA) que foi esticada sobre ar aquecido até que sua extremidade ficasse com aproximadamente 300-500 µm de diâmetro. As cânulas foram previamente preenchidas com solução salina isotônica contendo heparina (100U) e obstruídas com pinos de metal. Foi realizada uma incisão cervical nos animais que permitiu o acesso à artéria carótida, essa foi isolada e teve suas extremidades amarradas com o auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica SA, modelo SM 2002, Belo Horizonte, MG, Brasil). Em seguida, o cateter foi inserido no lúmen da artéria através de uma pequena incisão e foi firmemente amarrado e exteriorizado na nuca dos animais com o auxílio de um trocater.

Os registros da PAM e da FC foram realizados nos animais acordados e livres dentro das gaiolas, 48 horas após a colocação do cateter. Para o registro da PAM e da FC, o cateter foi vedado com um pino de aço de 23-gauge que estava conectado a um tubo de polietileno de aproximadamente 25 cm (PE 50; 0,023 mm ID X 0,038mm OD; Clay-Adams, EUA). A extremidade livre deste tubo foi acoplada a um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, EUA) previamente conectado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (Biopac System, Santa Barbara, CA, EUA).

4.7 Determinação dos parâmetros biológicos

4.7.1 Peso corporal, peso dos rins e razão de peso do coração pelo comprimento da tíbia

Animais com aproximadamente 23g foram separados aleatoriamente e submetidos a operação fictícia ou a indução da hipertensão. Após vinte e oito dias os animais foram novamente pesados, obtendo-se o peso corporal final.

No último dia do protocolo experimental, o coração e os rins destes animais foram isolados, lavados com solução fisiológica o excesso de líquido foi removido com papel toalha e foram mantidos na estufa a 37°C por 24 horas para obtenção do peso seco. Para verificar a existência de hipertrofia cardíaca foi dividido o peso do coração (mg) pelo comprimento da tíbia (cm). Também foi calculada a razão entre

rim esquerdo e rim direito para determinar a presença de hipertrofia renal direita e atrofia renal esquerda.

4.8 Reatividade vascular do leito mesentérico

Para avaliar a reatividade vascular, foi utilizado o leito vascular mesentérico (LVM) isolado, segundo trabalhos anteriores do nosso laboratório (ARRUDA, *et al.*, 2005; COLA, *et al.*, 2009). Após o animal ser anestesiado com tiopental (100mg/kg) por via intraperitoneal, a artéria mesentérica superior foi isolada através de uma incisão abdominal com, aproximadamente, 5 cm transversalmente e nesse vaso foi introduzida uma cânula de polietileno (PE50). Imediatamente, o leito foi perfundido com solução nutritiva de Krebs (NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄.7H₂O 1,17mM; CaCl₂.H₂O 1,60 mM; KH₂PO₄ 1,18mM; NaHCO₃ 14,90 mM; EDTA 0,02Mm; Glicose 11,10mM), mantida a 37°C e aerada constantemente por meio de borbulhamento da mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (White Martins Ltda, Cariacica, ES, Brasil), sendo o pH mantido a 7,4. O LVM foi cuidadosamente isolado do intestino e colocado num banho de órgão isolado. Por meio de uma bomba peristáltica (Peri Star Pro, World Precision Instruments, Sarasota, USA), foi mantido um fluxo pulsátil de 3,0 mL/min e uma pressão de perfusão média de aproximadamente 48 mmHg. A pressão de perfusão foi medida através de um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, EUA) conectado a um amplificador de pressão e os dados foram registrados por um sistema de aquisição de dados (BioPac Systems, Holliston, MA, USA). Após um período de estabilização de 30 minutos, o LVM foi submetido a testes farmacológicos para avaliação da função vascular. Para estudo da função endotelial foi utilizado a Acetilcolina (ACh, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA São Paulo, Brasil), que é um vasodilatador dependente do endotélio, e, posteriormente, foi utilizado nitroprussiato de sódio (NPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), um vasodilatador independente do endotélio por doação de óxido nítrico (NO) para avaliação da sensibilidade do músculo liso ao NO. O percentual de relaxamento vascular às drogas vasodilatadoras foi obtido através do relaxamento atingido na pré-contracção induzida pela norepinefrina (NOR, Hipolabor, Minas Gerais, Brasil), um agonista α 1-adrenérgico.

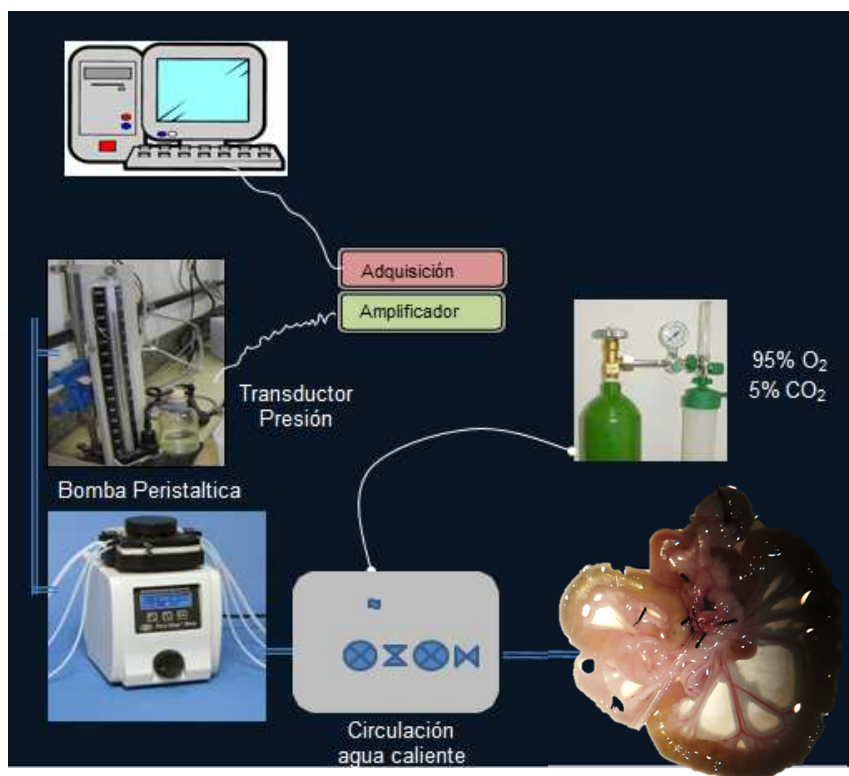


Figura 7: Esquema representativo do sistema utilizado para realização do estudo da reatividade. Fonte: Adaptado Vasquez, 2013.

4.8.1. Reatividade vascular do LVM a ACh

Após o período de estabilização o LVM foi submetido a uma pré-contracção induzida por Nor diluída em Krebs ($9,81 \times 10^{-6} \text{M}$) para formação de um platô de contracção. Após a formação deste foram realizadas injeções “in bolus” (0,1 mL) de ACh (3×10^{-7} a 3×10^{-2}), para avaliação da função endotelial dos animais.

4.8.2 Reatividade vascular do LVM a ACh na presença de bloqueadores farmacológicos

Após a realização da curva ACh sem bloqueio o LVM foi perfundido com Krebs contendo bloqueadores farmacológicos para avaliação de possíveis mecanismos e vias envolvidas no relaxamento.

4.8.2.1 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio do LVM

Para avaliar a participação do NO no relaxamento vascular dependente do endotélio, doses de ACh foram administradas após o leito vascular ser perfundido por um período de 30 minutos com N^G – nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4}M), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS).

4.8.2.2 Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxigenase (COX) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio no relaxamento dependente do endotélio do LVM

Para avaliar a participação dos prostanóides e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na função endotelial do LVM, as doses de ACh foram administradas após o leito vascular ser perfundido por 30 minutos com um bloqueio simultâneo L-NAME(10^{-4} M) + Indometacina (10^{-5} M), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase.

Para verificação da magnitude da participação dos derivados dos prostánoides foi realizado o cálculo da diferença da área abaixo da curva do bloqueio realizado com L-NAME da área abaixo da curva obtida com o bloqueio simultâneo de L-NAME+indo. Para verificarmos a participação do EDHF, foi calculado a área abaixo da curva residual após a realização do bloqueio com L-NAME, indometacina e apocinina.

4.8.2.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio do LVM

Para verificação da influência de EROs produzidos pela NADPH oxidase no relaxamento endotelial, o leito vascular foi perfundido por 30 minutos com Apocinina (30μ M) que é um inibidor da enzima, seguido de doses crescentes de ACh.

4.8.2.4 Verificação das respostas obtidas na reatividade vascular

As respostas obtidas pelo relaxamento provocado pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contração obtida pela NOR no LVM. Foram calculados a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e o pEC_{50} , que representa o logaritmo negativo da dose de ACh capaz de produzir 50% da resposta máxima. Para comparar a magnitude de efeito dos bloqueadores sobre a resposta de relaxamento a ACh nos grupos estudados, o resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC), ou seja, área abaixo da curva controle – área abaixo da curva com bloqueio, exceto para os derivados dos prostanóides e EDHF. Para verificar a participação dos derivados dos prostánoides foi realizado o seguinte cálculo, área abaixo da curva obtida na curva L-NAME – área abaixo da curva obtida após o bloqueio silmultâneo L-NAME+indo. Para verificarmos a participação do

EDHF, foi calculado a área abaixo da curva residual após a realização do bloqueio com L-NAME, indometacina e apocinina.

4.9 Determinação dos níveis de Angiotensina II do rim esquerdo

Após os animais serem anestesiados, o rim esquerdo foi retirado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80°C até o momento da preparação das amostras. Os níveis de Ang II foram medidos usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Previamente, a Ang foi extraída do rim esquerdo e as amostras foram homogeneizadas e purificadas usando colunas C18 Oasis (Waters Corporation), que foram previamente ativadas com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas na mistura de etanol, ácido acético e água (90/4/6). Os eluatos foram liofilizados e redissolvidos em 500 µL de fase móvel A (5% de acetonitrila em 0,1% de ácido fosfórico), e então filtrados com membrana de 0,22 µm para serem analisados.

Os peptídeos foram separados em coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6mm), 7µ, (PerkinElmer's Brownlee Columns), utilizando 5 minutos de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC. A angiotensina foi identificada de acordo com o período de retenção (<6%) e a altura do pico (<5%) utilizando curva padrão de concentração conhecida e os valores foram normalizados de acordo com o peso do rim.

4.10 Isolamento das células do rim esquerdo

O rim esquerdo dos animais foram coletados e processados para avaliar os níveis de dano no DNA das células, o estresse oxidativo e a biodisponibilidade de NO. Para o isolamento das células, os rins foram triturados com tesoura cirúrgica e incubados a 37°C por 30 minutos em solução de extração contendo proteinase K

(0,1% m/v -Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e collagenase tipo II (0,2% m/v - GibcoLife Technologies, São Paulo, SP, Brazil), dissolvidos em uma solução tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente, o extrato foi filtrado através de uma tela de nylon (BD Falcon 70µm, San Jose, Califórnia, EUA) acoplada em tubo falcon para remover os debris celulares. Em seguida, as amostras filtradas foram lavadas duas vezes com PBS, através de centrifugação (10 minutos a 2600 rpm), para remoção das enzimas. Finalmente as amostras foram armazenadas em solução contendo 40% de soro bovino fetal (SFB, Gibco), 10% dimetil sufóxido (DMSO, Sigma) e 50% RPMI e foram estocadas a -80°C.

4.11 Análises pela Citometria de fluxo

4.11.1 Análise da viabilidade celular

Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o corante intracitoplasmático iodeto de propídeo (PI). O PI, é um marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Uma suspensão de células de concentração 10^6 , foram incubadas com 2 µL de PI (500µg/mL) por um período de 5 minutos, no escuro e com temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e analisadas pelo citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA). Para quantificar a viabilidade, as amostras foram analisadas em triplicatas, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura. As células foram excitadas a 488 nm e para detecção da fluorescência do PI, foi utilizado filtro 585/42. Os dados foram expressos pela porcentagem de células não viáveis/porcentagem de células viáveis.

4.11.2 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio no rim clipado

Dihidroetídeo (DHE) e 2',7'- diacetato de dicloro fluoresceína (DCF-DA) foram usados para determinar os níveis intracelulares de ânions superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. Os níveis de ânion superóxido $\bullet O_2^-$ foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o $\bullet O_2^-$ formando etídeo. Quando o DHE é oxidado à etídeo e se liga ao DNA, causa a amplificação da fluorescência vermelha. A oxidação do DHE é quantitativamente proporcional a concentração de $\bullet O_2^-$ na célula.

A produção de H_2O_2 foi estimado por meio da citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é um produto da oxidação do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) um éster, não fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula sofre ação de esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 formando um composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula. Portanto, a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de H_2O_2 na célula.

As células renais foram ressuspensas em 1 mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160 mM) and DCF-DA (20 mM), por 30 minutos à 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadas por 5 minutos com 10 μ M doxorrubicina ou 50 mM H_2O_2 , enquanto que para controle negativo as amostras foram incubadas apenas com etanol. As células então foram lavadas e ressuspensas com PBS e mantidas no gelo e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva (Becton Dickinson, San Juan, CA) e a sobreposição dos histogramas foram construídos usando o FCS Express software. Para quantificação da fluorescência emitida pelo DHE e DCF, as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488nm e os sinais foram obtidos utilizando filtros 585/42 e 530/30, respectivamente, e os dados foram expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência emitida (MFI).

4.11.3 Detecção de Óxido Nítrico intracelular

Para detecção e estimativa da biodisponibilidade do NO foi usado a substância diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2D, 2Mm), que na presença de NO, emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional à biodisponibilidade intracelular de NO. Então, este foi adicionado em uma suspensão de células (10^6) e incubada a 37°C, por 18 minutos, no escuro. Para controle positivo, as amostras foram incubadas com 10 µM de nitroprussiato de sódio. As células então foram lavadas, ressuspendidas com PBS, mantidas no gelo e protegidas da luz para aquisição imediata dos dados no citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson). A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva (Becton, Dickinson) e a sobreposição do histograma foi construído usando o FCS Express software. Para quantificação da fluorescência emitida pelo DAF-2T, as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488nm e o sinal foi obtido utilizando filtro 530/30, e os dados foram expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência emitida (MFI).

4.12 Ensaio do cometa alcalino

O ensaio do cometa é uma técnica bem validada para medir o dano no DNA em células individuais (RODRIGUES, *et al.*, 2013). Lâminas histológicas foram pré-tratadas com uma camada de agarose 1,5% de ponto de fusão normal dissolvida em PBS e mantida a 65°C. Posteriormente, 20 µL de suspensão de células (10^4) foram misturadas com 100µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%, dissolvida em PBS e mantidas a 37 °C. A mistura contendo agarose de baixo ponto de fusão e a suspensão celular foi espalhada sobre as lâminas com a primeira camada que foram cobertas com uma lamínula e resfriadas a 4°C por 20 minutos para a polimerização da agarose. Posteriormente, as lamínulas foram delicadamente retiradas e as lâminas foram imersas em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-Lauroilsarcosina de sódio 34 mM, e o pH ajustado entre 10,0-10,5, e por último foi adicionado 1% Triton X-100 e 10% DMSO). A lise ocorreu por uma hora a 4°C e protegidas da luz. Em seguida, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão alcalina (pH>13) por 40 minutos a 4°C,

preparada com NaOH 300mM e EDTA 1mM, as lâminas estavam dispostas na posição para corrida, as condições de eletroforese foram ajustadas a 20V, amperagem a 300mA por 30 minutos. Ao final da eletroforese, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba e submetidas à etapa de neutralização, com três lavagens de 5 minutos, em solução tampão neutro (Tris 0,4M, pH 7,5). Após a neutralização, as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas a temperatura ambiente por uma hora. A migração dos fragmentos de DNA, que podemos chamar de cauda, foi visualizada após a coloração com brometo de etídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 20 µg/mL. A análise foi realizada imediatamente após a coloração, em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, USA) equipado com filtro de 590nm com aumento de 20x. As imagens foram adquiridas através da câmara digital (Nikon) e foram analisadas com um programa de domínio público CASP. Este programa fornece vários parâmetros analisados, nós utilizamos a porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda para analisarmos o dano no DNA. Cerca de 100 cometas em cada lâmina foram aleatoriamente fotografados para posterior análise, sendo que as análises foram realizadas em duplicatas. Na figura 8, podemos verificar passo a passo de algumas etapas do ensaio do cometa alcalino.

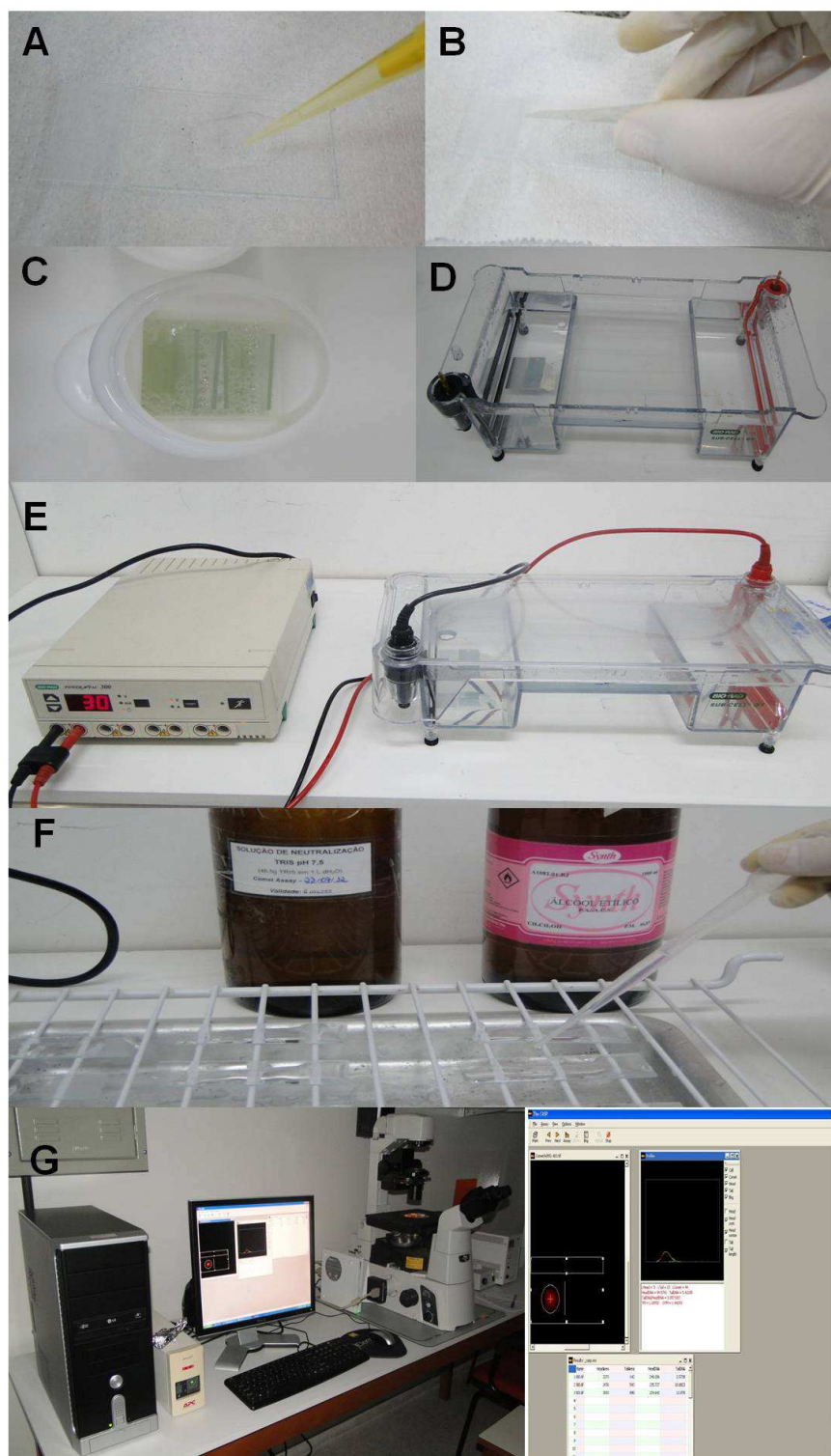


Figura 8. Ensaio do cometa: A- preparo da segunda camada de agarose, B- colocação da lamínula, C- etapa de lise, D- etapa de desenovelamento do DNA, E- eletroforese, F- neutralização e fixação, G- microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) equipado com filtro de 585nm (G-2E/C; Nikon) e câmera digital de 12.7 megapixels (Ds-Ri; Nikon), detalhe da interface do programa CASP com o cometa selecionado e a análise do seu perfil. Fonte: Rodrigues, 2013.

4.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos na citometria foram expressos como média geométrica da intensidade de fluorescência ou percentagem de células viáveis. Sempre que os valores, como neste caso, e nas demais medidas, o teste de normalidade foi positivo, as médias dos valores entre os grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, completamente randomizada. Na comparação das curvas dose-resposta do leito vascular mesentérico, a ANOVA utilizada foi de 2-vias para medidas repetidas. Quando a ANOVA resultou em diferenças significantes, esta análise foi seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Na análise estatística foi utilizado o software de bioestatística Prism 6.0 (Graphpad, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros hemodinâmicos

Conforme demonstrado na figura 9, os animais 2R1C apresentam um aumento da PAM (125 ± 2 mmHg) quando comparados aos animais do grupo sham (107 ± 2 mmHg). Em nosso trabalho, observamos que o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir os níveis de PAM dos animais tratados em 13 mmHg. Na figura 10 podemos observar que os animais do grupo 2R1C apresentam taquicardia quando comparados aos animais do grupo sham (516 ± 2 ; 451 ± 18 bpm, respectivamente), e o tratamento com sildenafil (471 ± 12 bpm) foi capaz de proporcionar uma redução dessa taquicardia.

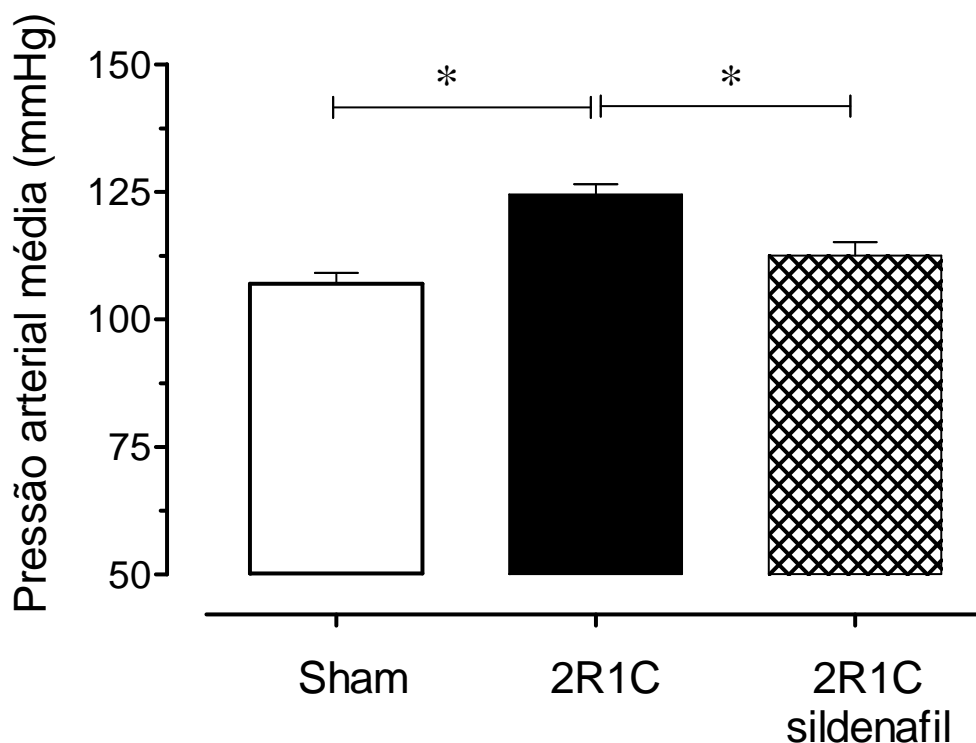


Figura 9. Gráfico da pressão arterial média dos grupos experimentais. Os valores indicam média \pm EPM. * $p < 0,05$.

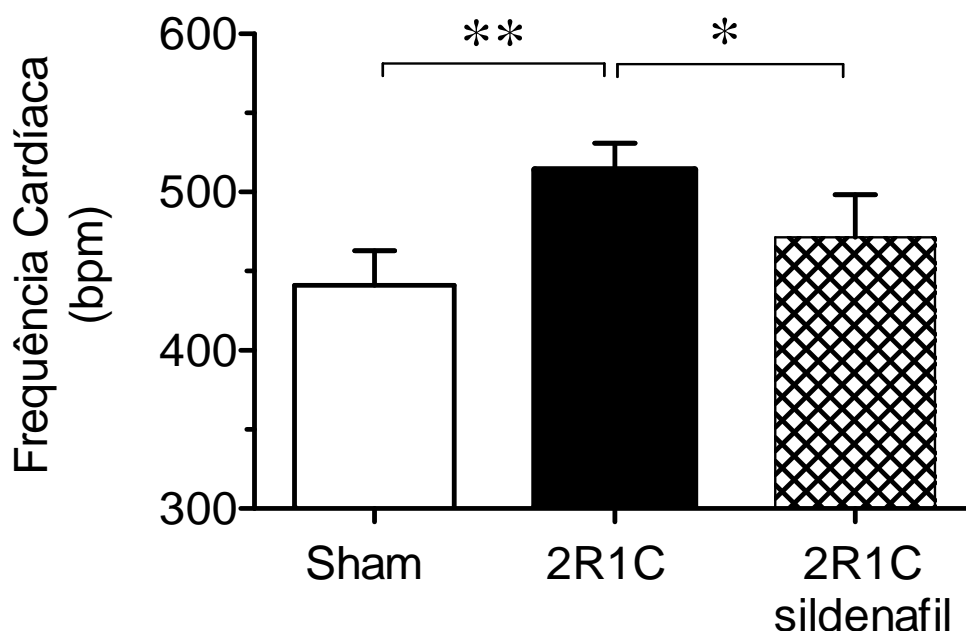


Figura 10. Gráfico da frequência cardíaca dos grupos experimentais. Os valores indicam média \pm EPM. * $p < 0,05$

5.2 Avaliações do peso corporal final e dos órgãos

Ao final do tratamento os animais foram pesados e podemos observar que os 2R1C apresentaram uma redução no ganho do peso corporal, quando comparados ao grupo sham e os animais tratados com sildenafil tiveram o peso corporal igual ao grupo controle, conforme demonstrado na tabela 1. O modelo experimental 2R1C se dá pela estenose da artéria renal esquerda e, conforme já descrito na literatura e observado na tabela 1 e na figura 11A, esse modelo causa atrofia do rim clipado e hipertrofia do rim não clipado dos animais 2R1C, como confirmado pela diminuição da razão do peso do rim clipado/ peso rim não-clipado quando comparado aos animais do grupo sham e atenuado pelo tratamento com o sildenafil. Interessantemente, no grupo 2R1C tratado com sildenafil podemos observar uma menor atrofia do rim clipado e também uma redução da hipertrofia do rim não clipado. Na análise da razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia não encontramos diferença entre os grupos. Observamos que o rim clipado dos animais

2R1C apresentam uma diminuição na porcentagem da viabilidade das células do rim, quando comparada ao grupo sham e o tratamento com sildenafil foi capaz de aumentar a viabilidade das células do rim clipado dos animais tratados. Assim, podemos verificar que o tratamento com sildenafil foi capaz de restaurar as alterações no rim clipado causadas pelo modelo de hipertensão.

Tabela 1. Peso corporal e dos órgãos dos modelos experimentais

Parâmetros	Sham (8)	2R1C (8)	2R1C sildenafil (6)
Peso corporal (g)	26 ± 0.5	24 ± 0.4*	25 ± 0.3
Peso do rim clipado (mg)	42 ± 2.0	29 ± 2.6*	38 ± 0.7 [#]
Peso do rim não-clipado (mg)	45 ± 1.2	49 ± 0.3*	43 ± 1.2 [#]
Rim clipado/rim não-clipado	0.93±0.04	0.54±0.09**	0.88±0.06 [#]
Peso coração/comprimento da tibia (mg/cm)	20.5±0.5	20.4±1.3	20.1±0.7
Viabilidade das células do rim (%)	99±0.13	94±1.5**	98 ± 0.6 [#]

Valores expressos como média ± EPM. *p<0,05 2R1C vs. sham; [#]p< 0,05 2R1C vs. 2R1C sildenafil

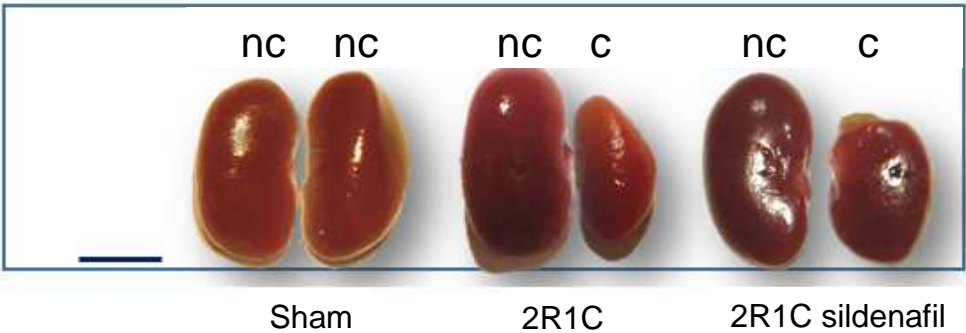


Figura 11: Imagens macrofotográficas típicas dos rins (nc: não clipado, c: clipado), mostrando a atrofia do rim clipado e hipertrofia do rim contralateral, bem como os efeitos renoprotetores do Sildenafil. A barra horizontal indica 5 mm.

5.3 Níveis intrarenais de Angiotensina II

Como podemos observar na figura 12 o rim esquerdo dos animais 2R1C apresentou níveis aumentados de Ang II, quando comparados com o grupo sham

($179 \pm 32^* \mu\text{mol/g}$ vs. $70 \pm 7 \mu\text{mol/g}$ tecido, respectivamente) e o tratamento foi capaz de reduzir em 50% os níveis de Ang II no rim esquerdo dos animais tratados com sildenafil ($94 \pm 6 \mu\text{mol/g}$ tecido).

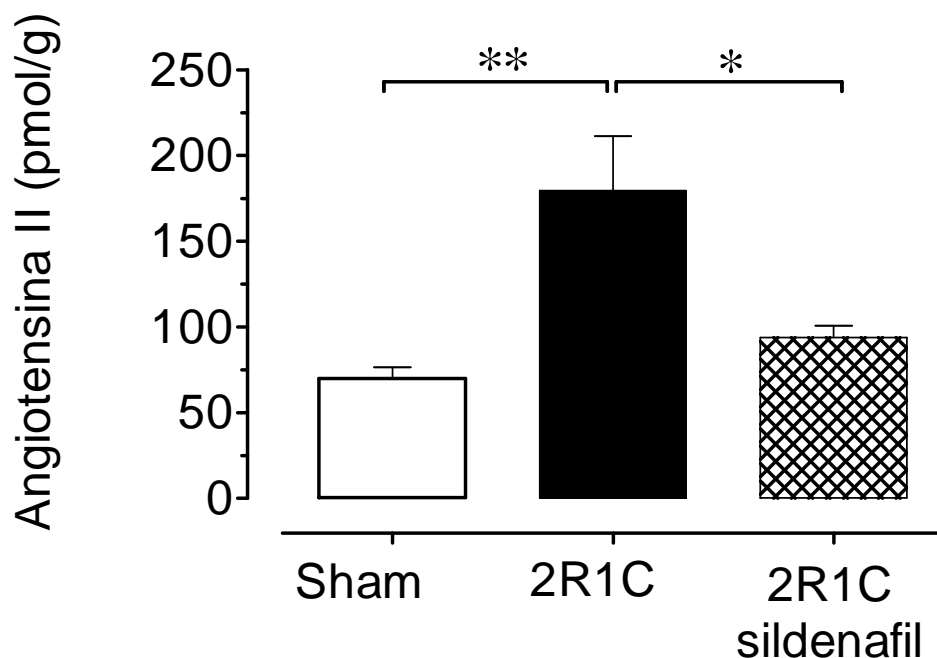


Figura 12: Gráfico representando os efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis teciduais de angiotensina no rim esquerdo após 28 dias da cirurgia. Os valores indicam a média \pm EPM. $^{**}p < 0,01$.

5.4 Reatividade vascular

5.4.1 Resposta do endotélio à ACh – Vasodilatador dependente do endotélio

Para avaliar a função endotelial dos grupos estudados foram feitas curva de relaxamento à ACh após a pré-contração, conforme apresentado nas figuras 13A e 13B. Na figura 13A e na tabela 2 podemos observar que os animais 2R1C ($48,7 \pm 1,8 \%$) apresentaram um comprometimento da função endotelial com uma redução significativa no relaxamento do LVM quando comparados com o grupo sham ($76,13 \pm 2,5 \%$).

Como podemos observar na figura 13B e tabela 2, o tratamento com sildenafil ($67,48 \pm 3,8 \%$) foi capaz de reestabelecer a função endotelial dos animais tratados, visto que restaurou o prejuízo no relaxamento causado pela hipertensão.

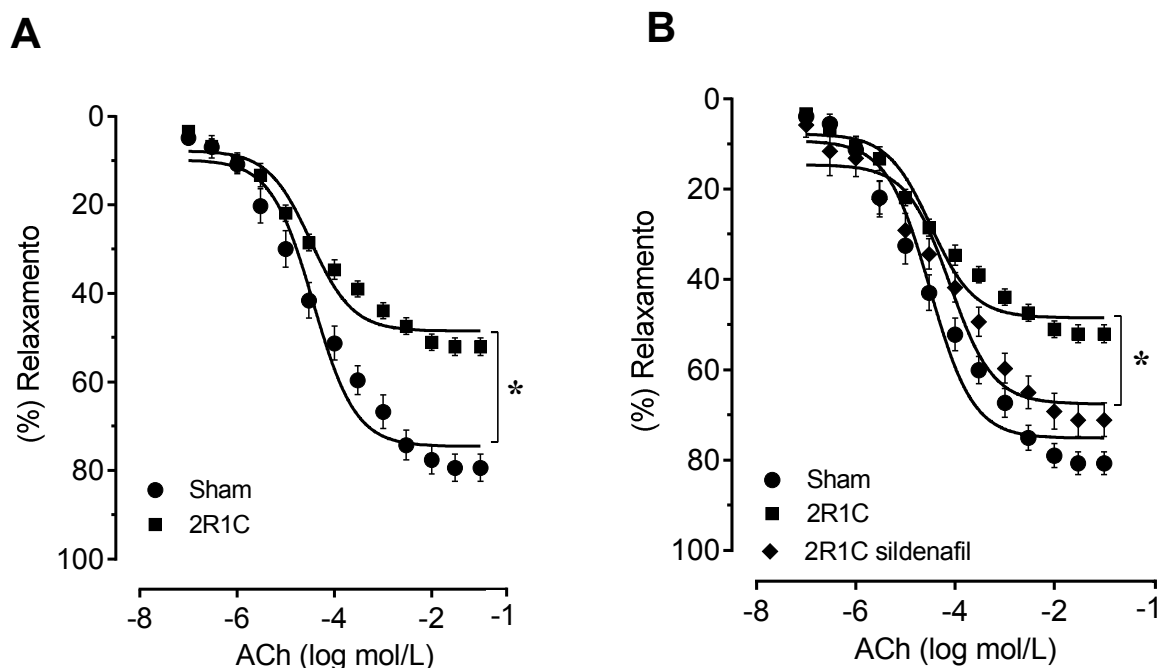


Figura 13. Relaxamento endotélio-dependente à acetilcolina em artéria mesentérica de animais 2R1C e sham. A - Podemos verificar um prejuízo no relaxamento do LVM dos animais 2R1C quando comparado ao grupo sham. B – Verificamos que o tratamento com sildenafil foi capaz de restaurar o prejuízo no relaxamento do LVM apresentado pelos animais submetidos à hipertensão. Valores expressos como média \pm EPM * $p < 0,05$.

Tabela 2. Efeito do sildenafil na eficácia ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de Acetilcolina *in bolus* nos grupos sham, 2R1C e 2R1C sildenafil.

Parâmetro	Sham (10)	2R1C (8)	2R1C sildenafil (6)
$R_{\text{máx}}$ (%)	76,13 \pm 2,5	48,7 \pm 1,8**	67,48 \pm 3,8 ^{##}
pEC_{50}	4,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1

$R_{\text{máx}}$: resposta máxima (eficácia). pEC_{50} : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo sham e ^{##} $p < 0,05$ quando comparado ao 2R1C.

5.4.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio

A avaliação do papel da via do NO no relaxamento induzido pela ACh foi realizado por meio da incubação do LVM com L-NAME, um inibidor não seletivo da

NOS. O bloqueio ocasionou uma redução no relaxamento de todos os grupos estudados, como podemos observar na figura 14 e tabela 4. Entretanto, a magnitude da influência do NO na resposta a ACh foi diferente entre os grupos, conforme demonstrado pela diferença na área abaixo da curva com e sem bloqueio, em cada um dos grupos estudados (figura 14D), no qual a diminuição do relaxamento provocado pelo L-NAME representa a participação do NO na vasodilatação.

A participação do NO no relaxamento dependente do endotélio do grupo 2R1C (dAUC: $51 \pm 5,5$ a.u) está 34% menor, quando comparado ao grupo sham (dAUC: $77 \pm 4,7$ a.u), como podemos observar na figura 14D, pela redução da diferença da área abaixo da curva nestes animais. A disfunção vascular observada nos animais 2R1C com redução da participação do NO na vasodilatação dependente do endotélio foi restaurada pelo tratamento com sildenafil, pelo aumento da área abaixo da curva observada nos animais tratados (dAUC: $74 \pm 6,5$ a.u).

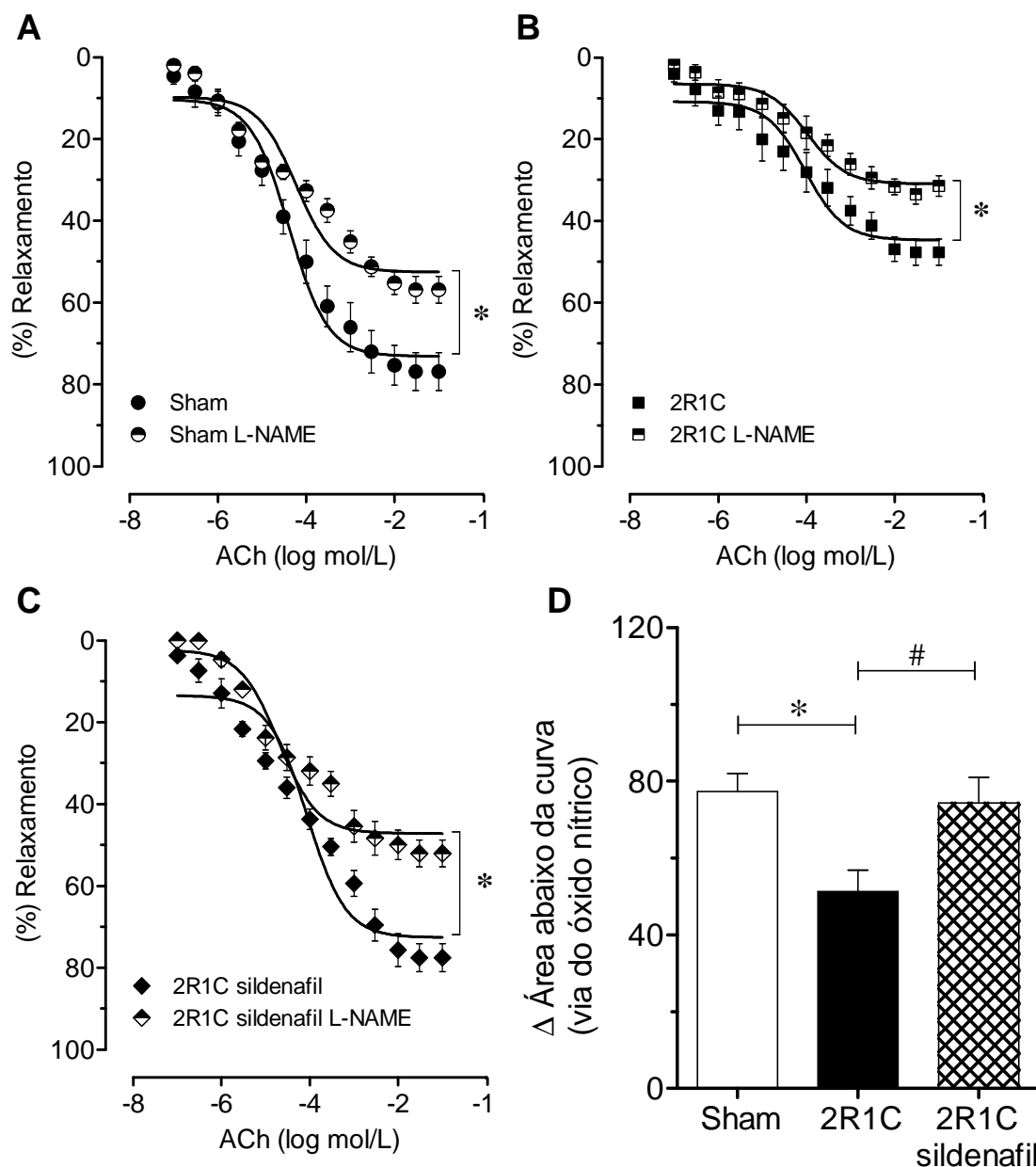


Figura 14. Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio A – Refere-se à curva de relaxamento do grupo Sham na presença e ausência do bloqueio realizado com L-NAME. B – Refere-se à curva de relaxamento do grupo 2R1C na presença e ausência do bloqueio com L-NAME. C – Refere-se à curva de relaxamento do grupo 2R1C tratado com sildenafil na presença e ausência de L-NAME. D – Representação gráfica da diferença entre a área abaixo da curva (dAUC) na presença e ausência do bloqueio realizado com L-NAME em cada um dos grupos experimentais. Podemos verificar que o NO tem maior participação no relaxamento do grupo sham e no tratado com sildenafil quando comparado com o grupo 2R1C. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$

quando comparado ao grupo sham; [#]p<0,05 quando comparado ao 2R1C e *p<0,05 quando comparado ao mesmo grupo sem bloqueio.

Tabela 3. Efeito do sildenafil na eficácia ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de Acetilcolina *in bolus* nos grupos sham, 2R1C e 2R1C sildenafil na ausência e presença de L-NAME e L-NAME + indometacina.

Parâmetro	Sham (7)	2R1C (6)	2R1C sildenafil (7)
Ach			
$R_{\text{máx}}$ (%)	76,4 ± 5,3	43,2 ± 4,2**	71,47 ± 3,0 ^{##}
pEC_{50}	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Ach + L-NAME			
$R_{\text{máx}}$ (%)	53,49 ± 2,7 ^{&}	30,76 ± 1,8 ^{**&}	48,73 ± 4,0 ^{##&}
pEC_{50}	4,1 ± 0,2	4,15 ± 0,2	4,6 ± 0,2
Ach + L-NAME + indo			
$R_{\text{máx}}$ (%)	47,92 ± 4,1 ^{&&}	31,32 ± 2,0 ^{*&}	35,43 ± 4,8 ^{&&}
pEC_{50}	4,03 ± 0,2	4,2 ± 0,09	3,8 ± 0,5

$R_{\text{máx}}$: resposta máxima (eficácia). pEC_{50} : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos como média ± EPM. * p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo sham; [#]p<0,05 e ^{##}p<0,01 quando comparado ao 2R1C e [&]p<0,05 e ^{&&}p<0,01 quando comparado ao mesmo grupo sem bloqueio.

5.4.3 Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase no relaxamento dependente do endotélio

Para avaliação da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase e a influência da participação dos prostanóides na vasodilatação foi realizado a análise da diferença da área abaixo da curva (dAUC), subtraindo a dAUC na presença de L-NAME da dAUC após a inibição com L-NAME + indo, no qual aumento da resposta provocada pela indo representa a participação dos derivados da COX na vasodilatação (Figura 15E). Observa-se que os animais 2R1C (9,0 ± 3,8 a.u.) apresentam uma redução da participação dos derivados dos prostánoides quando comparamos com grupo sham (32,7 ± 4,7 a.u.). O tratamento com sildenafil (29,6 ± 6,5 a.u.) foi capaz de aumentar a participação dos derivados dos prostánoides nos animais hipertensos.

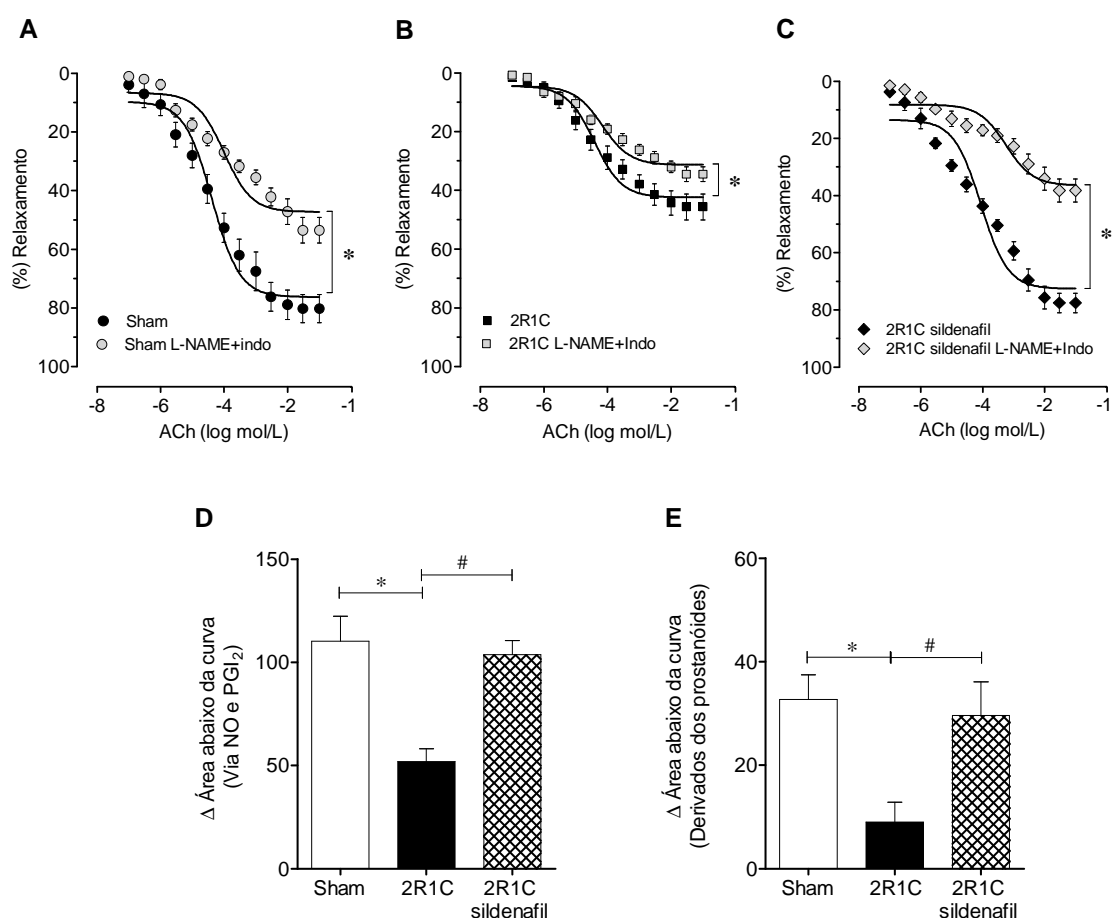


Figura 15: Participação dos prostanóides derivados da ciclooxygenase no relaxamento dependente do endotélio A – Refere-se à curva de relaxamento do grupo sham na presença e ausência do bloqueio simultâneo realizado com L-NAME e indometacina (Indo). B – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C na presença e ausência do bloqueio duplo com L-NAME+Indo. C – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C tratado com sildenafil na presença e ausência do bloqueio duplo de LNAME + indo. D – Representação gráfica da diferença entre as áreas abaixo da curva (dAUC) na presença e ausência do bloqueio simultâneo realizado com L-NAME + indo em cada um dos grupos experimentais. E – Representação gráfica da diferença da área abaixo da curva com bloqueio do L-NAME menos a área abaixo da curva obtida com o bloqueio simultâneo de L-NAME+indo (dAUC L-NAME- dAUC L-NAME+indo), desta forma, podemos observar a magnitude da participação da via da COX no relaxamento à ACh. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sham; # $p < 0,05$ quando comparado ao 2R1C e * $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo grupo sem bloqueio.

5.4.4 Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio

Para avaliarmos a influência das EROs e consequentemente do estresse oxidativo no relaxamento vascular à ACh, o LVM foi previamente incubado com apocinina, um inibidor específico da NADP(H) oxidase. Conforme demonstrado na figura 16 B e D, apenas os animais 2R1C apresentam participação importante das EROs na resposta à ACh, pois somente neste grupo houve uma melhora no relaxamento na presença de apocinina em relação a curva sem bloqueio. Nos grupos sham e 2R1C tratados com sildenafil não observamos diferença entre as curvas na presença ou ausência da apocinina. Desta forma, podemos inferir que o tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir o estresse oxidativo nestes animais, visto que o papel das EROs no relaxamento dos animais tratados é desprezível (figura 16C e tabela 4).

Os animais 2R1C apresentaram um aumento da diferença da área abaixo da curva de ($76,0 \pm 4,3^*$ a.u.) quando comparamos com o grupo sham ($48,7 \pm 5,9$ a.u.) e ao grupo tratado com sildenafil ($56,8 \pm 5,2^\#$ a.u.).

Tabela 4. Efeito do sildenafil na eficácia ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de Acetilcolina *in bolus* nos grupos sham, 2R1C e 2R1C sildenafil na ausência e presença de apocinina.

Parâmetro	Sham (7)	2R1C (7)	2R1C Sildenafil (7)
Acetilcolina			
$R_{\text{máx}}$ (%)	$74,3 \pm 5,3$	$48,90 \pm 2,1^{**}$	$67,38 \pm 3,6^{##}$
pEC_{50}	$4,8 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,2$
Acetilcolina + apocinina			
$R_{\text{máx}}$ (%)	$70,37 \pm 5,3$	$66,6 \pm 2,6^\&$	$61,46 \pm 2,8$
pEC_{50}	$3,7 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,2^{**}$	$4,1 \pm 0,1^\#$

$R_{\text{máx}}$: resposta máxima (eficácia). pEC_{50} : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos como média \pm EPM. $^{**}p<0,01$ quando comparado ao grupo sham; $^{##}p<0,05$ e $^{##}p<0,01$ quando comparado ao 2R1C e $^\&p<0,05$ quando comparado ao mesmo grupo sem bloqueio.

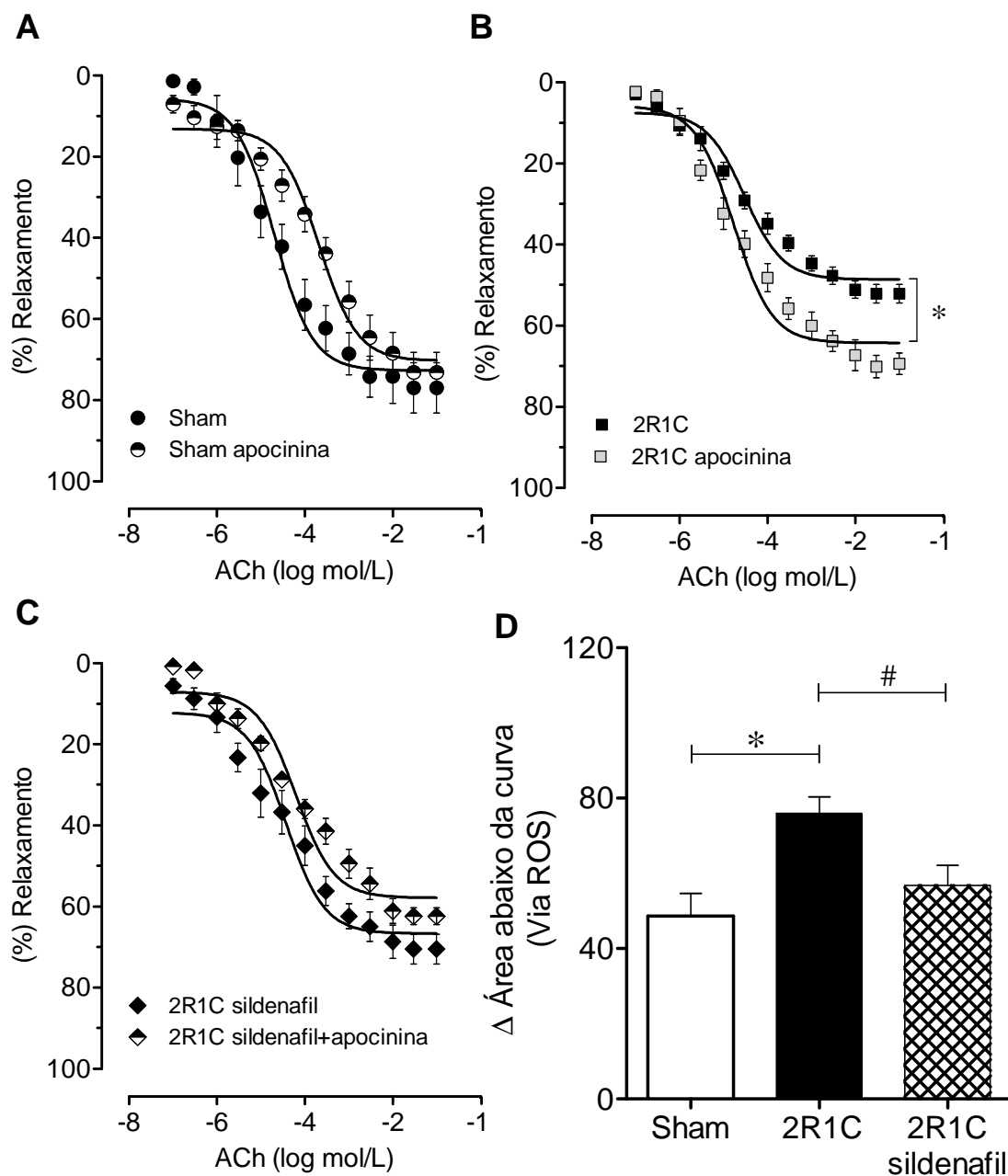


Figura 16. Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio. Refere-se à curva de relaxamento do grupo sham na presença e ausência do inibidor apocinina. B – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C na presença e ausência do inibidor apocinina, podemos observar que a inibição da NADP(H) promove aumento do relaxamento neste grupo C – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C tratado com sildenafil na presença e ausência do inibidor apocinina. D – Representação gráfica da diferença entre as áreas abaixo da curva (dAUC) na presença e ausência do inibidor apocinina em cada um dos grupos experimentais. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sham; # $p < 0,05$ quando comparado ao 2R1C e * $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo grupo sem bloqueio.

5.4.5 Estimativa da participação do NO, dos prostanóides, EROs e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) no relaxamento dependente do endotélio

Para estimativa da participação do EDHF no relaxamento do LVM subtraímos da área abaixo da curva sem bloqueio farmacológico a área abaixo da curva obtida após os bloqueios específicos para NOS, COX e NADP(H) oxidase, assim verificamos o relaxamento residual, podendo inferir que esse relaxamento foi provocado pela participação do EDHF. Analisando a figura 17 podemos observar que o EDHF é um importante fator contribuinte para o relaxamento do LVM e que o modelo de hipertensão 2R1C, causa uma redução da participação do EDHF na vasodilatação. A participação deste fator endotelial na disfunção vascular observada nos animais 2R1C é restaurada pelo tratamento com sildenafil (sham: 111; 2R1C: 31; sildenafil: 101 a.u.).

Na figura 17 podemos observar que o NO e a PGI₂ também estão diminuídos no grupo 2R1C (51 e 9 a.u., respectivamente) quando comparado com sham (NO: 77; PGI₂: 33 a.u.), caracterizando uma disfunção vascular nestes animais e o tratamento com sildenafil foi capaz de reestabelecer participação do NO e da PGI₂ (74 e 30 a.u., respectivamente) com isso promoveu uma melhora da função vascular destes animais. Podemos observar que nos animais 2R1C a inibição da NADP(H) promoveu um aumento significativo da área abaixo da curva, mostrando que a produção de ROS estava aumentada, havendo também um aumento do estresse oxidativo neste grupo, com isso podemos inferir que o sildenafil foi capaz de reduzir o estresse oxidativo nestes animais, visto que o papel das espécies reativas de oxigênio no relaxamento dos animais tratados estavam diminuídos. (sham: 49; 2R1C: 76 ; sildenafil: 56 a.u.)

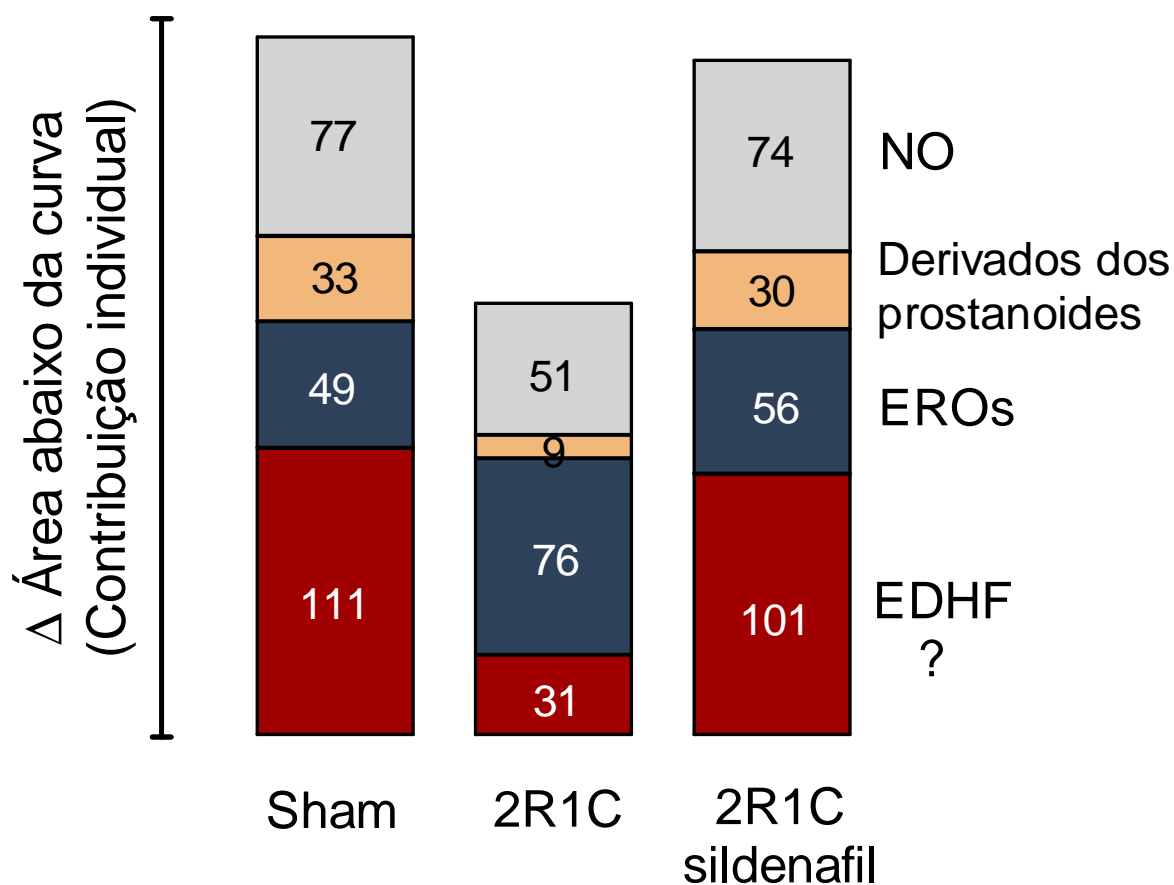


Figura 17. Importância da participação de cada uma das possíveis vias de disfunção endotelial. Refere-se à diferença da área abaixo da curva sem bloqueio farmacológico das curvas com bloqueadores da produção de cada vasoativo, isso se dá para NO, PGI₂ e EROs. Para estimativa da participação do EDHF, foi verificado o relaxamento residual após os bloqueios específicos.

5.4.6 Resposta do músculo liso ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio

Para avaliarmos a resposta do músculo liso vascular ao NO exógeno, independente do endotélio, realizamos uma curva dose-resposta de relaxamento ao doador de NO NPS. Os resultados estão demonstrados na tabela 5 e na figura 18. Podemos observar que não houve diferença na resposta muscular lisa ao NO entre os grupos estudados, não havendo alteração na sensibilidade do músculo liso ao NO.

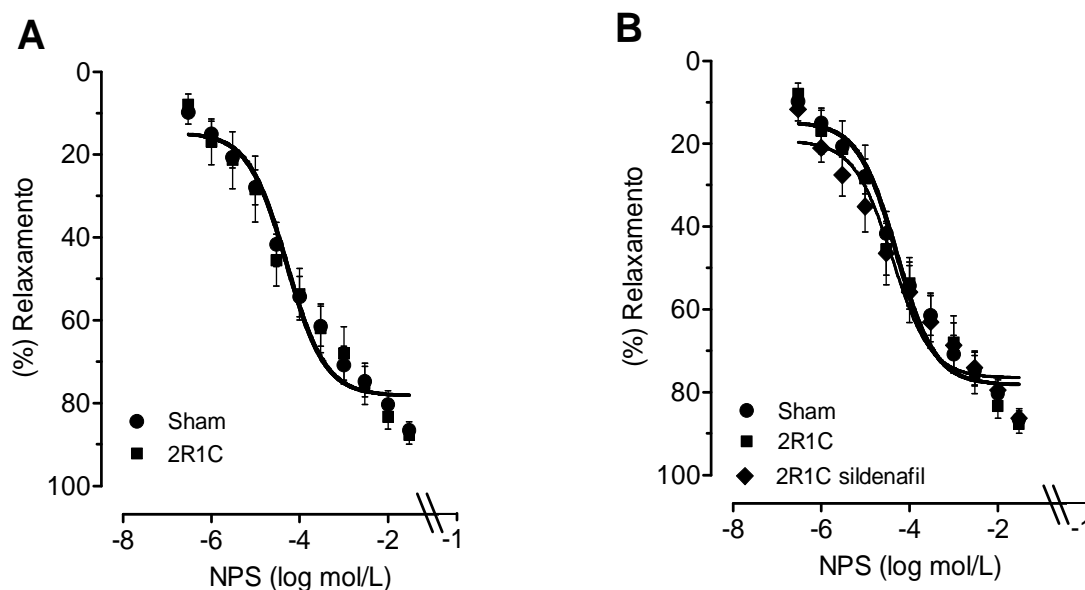


Figura 18. Estado funcional do músculo liso vascular. Refere-se a curvas dose-resposta ao nitroprussiato de sódio. Valores expressos como média \pm EPM.

Tabela 5. Valores da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e sensibilidade (pEC_{50}) no leito mesentérico obtido por meio de curva dose resposta de nitroprussiato de sódio (NPS) *in bolus* nos grupos sham, 2R1C e 2R1C sildenafil.

Parâmetro	sham (7)	2R1C (8)	2R1C sildenafil (8)
$R_{\text{máx}}$ (%)	$79,6 \pm 2,6$	$81,5 \pm 2,6$	$79,34 \pm 2,6$
pEC_{50}	$4,2 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$

$R_{\text{máx}}$: resposta máxima (eficácia). pEC_{50} : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade). Valores expressos como média \pm EPM.

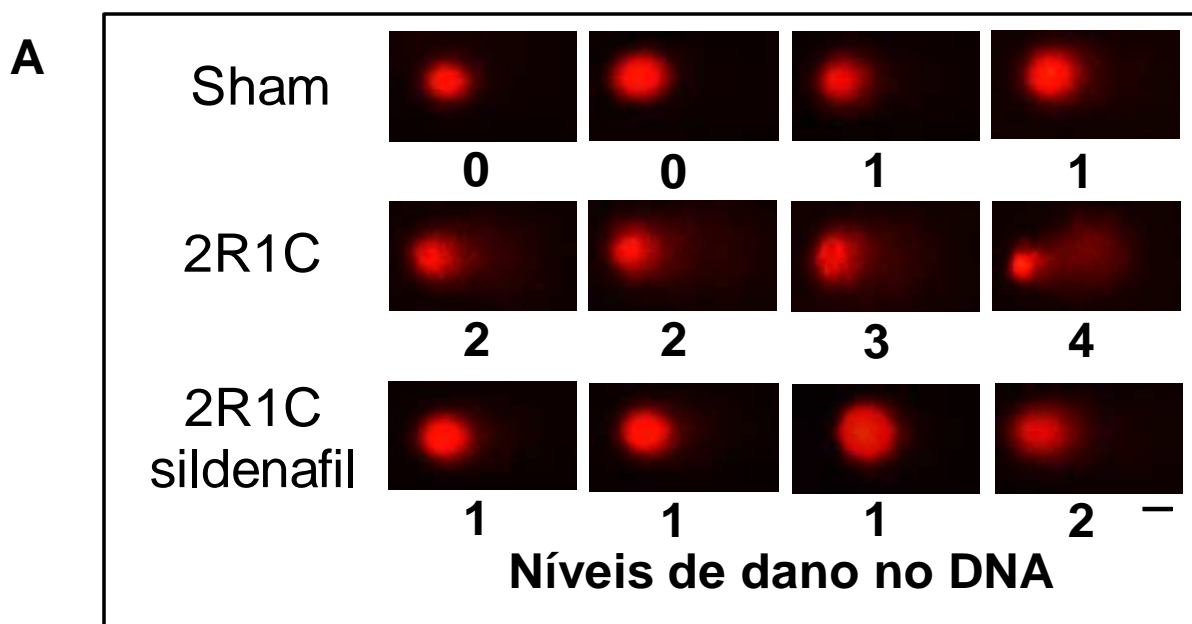
5.5 Avaliação dos níveis de fragmentação do DNA de células do rim clipado

Na figura 19A podemos observar que os animais do grupo 2R1C apresentam cometas com níveis 2, 3 e 4 de dano ao DNA, mostrando que os animais hipertensos apresentam maior fragmentação no DNA nas células do rim esquerdo quando comparados ao grupo sham (níveis 0 e 1). Já os animais tratados com

sildenafil apresentaram cometas de nível 1 e 2, demonstrando diminuição da fragmentação no DNA das células do rim esquerdo dos animais tratados.

Os fragmentos de DNA que migram durante a eletroforese é representado pela porcentagem de fragmentos de DNA na cauda. Na figura 19B podemos observar que o grupo 2R1C apresentou maior dano ao DNA ($38 \pm 5,7\%$), quando comparamos com o grupo sham ($21 \pm 2,1\%$) e grupo 2R1C tratado com sildenafil apresentou uma redução do dano ao DNA ($17 \pm 3,4\%$), com diminuição significativa de fragmentos de DNA na cauda.

Na figura 19C foi analisado o parâmetro do momento da cauda que é um índice que avalia tanto a migração do material genético quanto a quantidade relativa de DNA na cauda, relacionando a porcentagem de DNA na cauda com a intensidade da fluorescência. Podemos observar então, que os animais 2R1C apresentaram um aumento de 141% da fragmentação do DNA das células do rim clipado ($52,2 \pm 10$ a.u.) quando comparado ao grupo sham ($21,5 \pm 3,2$ a.u.) e o tratamento com sildenafil foi capaz de promover uma diminuição da fragmentação do DNA neste grupo ($17,3 \pm 3,5$ a.u.).



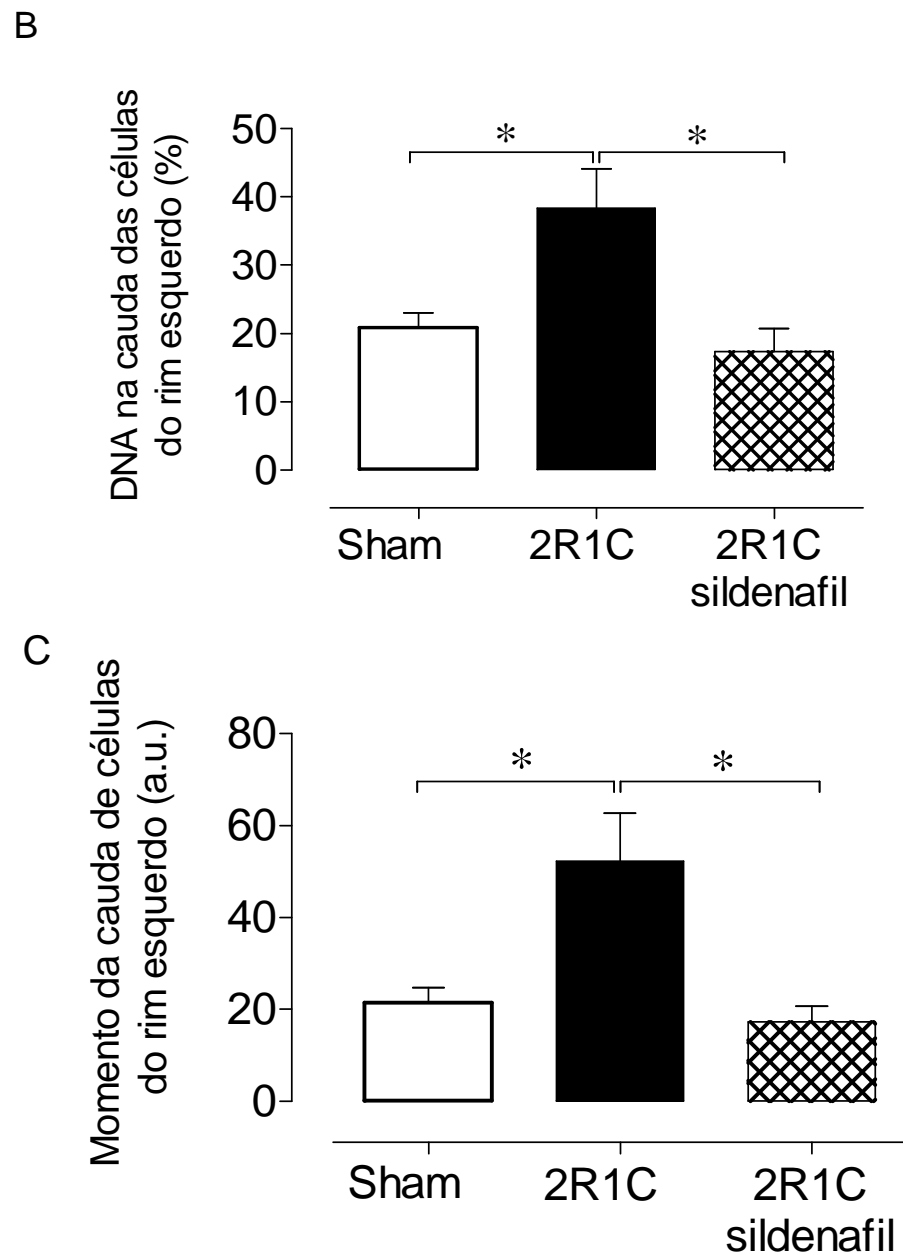


Figura 19: A – Fotos representativas dos cometas típicos dos 3 diferentes grupos segundo o grau de dano no DNA: : nível 0 – cometa intacto; nível 1 – 1-25% de dano no DNA; nível 2 – 25-45% de dano no DNA; nível 3 – 45-70% de dano no DNA, nível 4 – dano >70%. B- Gráfico representativo da porcentagem de DNA na cauda das células do rim esquerdo dos grupos sham, 2R1C e 2R1C tratado com sildenafil. C – Gráfico do momento da cauda das células do rim esquerdo dos grupos sham, 2R1C, 2R1C tratado com sildenafil. Os valores indicam média \pm EPM. * $p < 0,05$.

5.6 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio $\bullet\text{O}_2$ e H_2O_2 e detecção de NO nas células do rim clipado

Os níveis de EROs foram determinados pela média geométrica da intensidade de fluorescência (MIF – u.a.) emitida pela ligação das sondas DHE e DCFH-DA com o $\bullet\text{O}_2$ e H_2O_2 , respectivamente, produzidos pelas células. Os histogramas apresentados na figura 20 A e B são típicos da análise por citometria de fluxo e mostram um deslocamento para a direita da fluorescência das células dos animais hipertensos quando comparados aos animais sham e tratados com sildenafil. No gráfico de barras (figura C) observamos que os animais hipertensos apresentam um aumento da produção de EROs (DHE: 26%; DCF: 43%) em comparação as células do grupo sham (DHE: 700 ± 21 ; DCF: 214 ± 8 a.u.) e tratado com sildenafil DHE: 765 ± 32 ; DCF: 235 ± 20 a.u.). Estes dados confirmam o aumento da produção de EROs levando ao estresse oxidativo em células de animais hipertensos e o tratamento com sildenafil foi capaz de promover uma diminuição das EROs, consequentemente diminuindo do estresse oxidativo.

A produção de NO pelas células do rim clipado foi determinada pela média geométrica da intensidade de fluorescência (MIF – u.a.) emitida pelo DAF. A Figura 21A, mostra um histograma típico da análise por citometria de fluxo, mostrando um deslocamento, com aumento da intensidade emitida pelo DAF pelas células do rim do grupo tratado. Na figura 21B, o gráfico demonstra um aumento notável nos níveis de DAF pelas células renais do animais tratados com sildenafil (62%) quando comparamos com o grupo 2R1C e sham (260 ± 22 a.u.; 215 ± 9 a.u., respectivamente). Diante dos resultados, podemos observar que o sildenafil promove uma maior biodisponibilidade de NO.

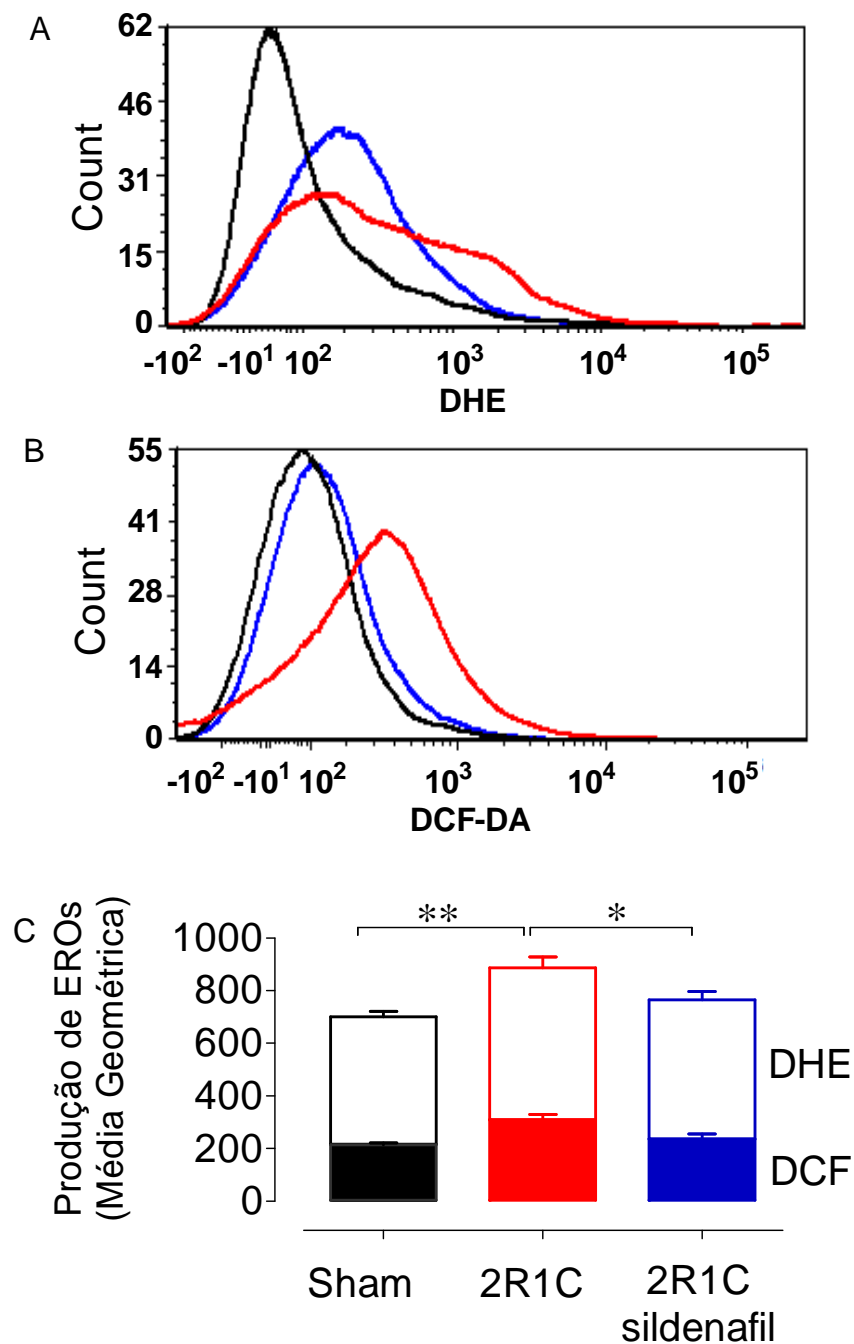


Figura 20: A e B– Representação dos histogramas da citometria de fluxo comparando a intensidade da fluorescência do DHE e DCF nos grupos sham, 2R1C e 2R1C tratado com sildenafil. C – O gráfico de barras mostra a intensidade da fluorescência causada pela produção de EROs pelo DHE (barra incolor) e DCF-DA (barra colorida). *p<0,05 e **p<0,01.

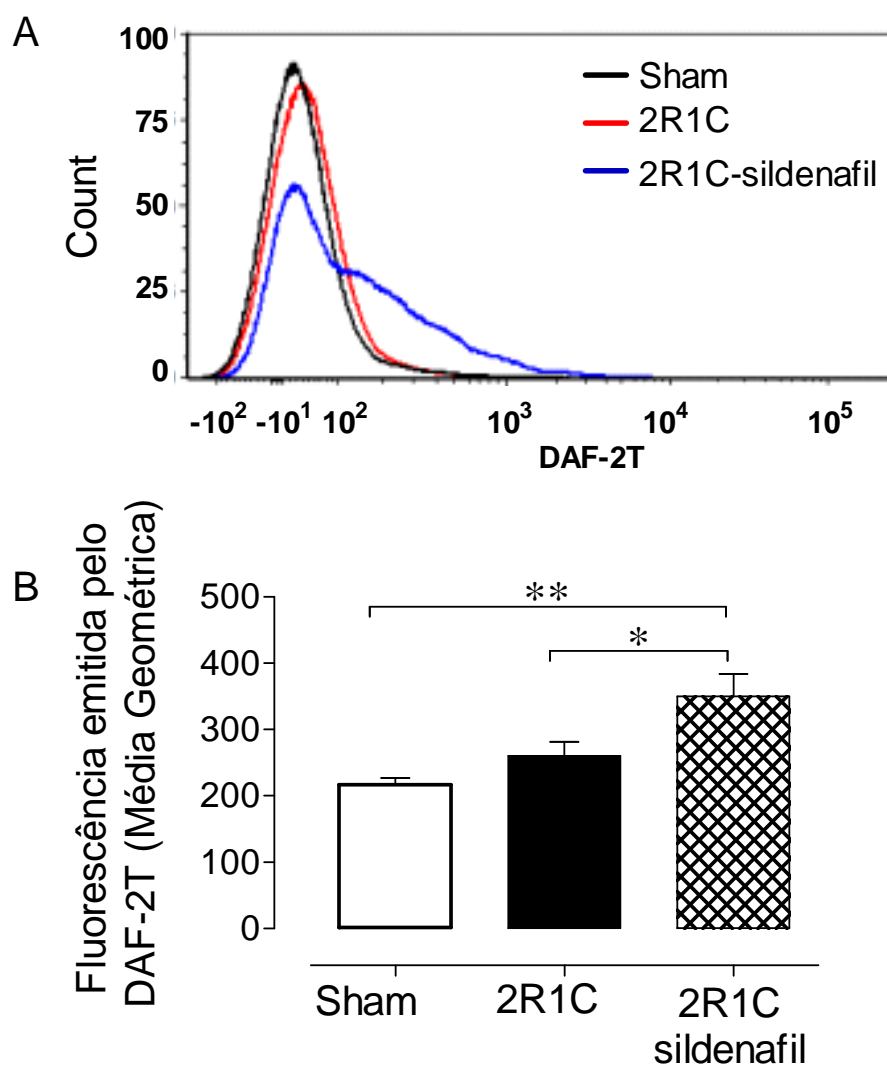


Figura 21: A- Histograma típico da citometria de fluxo comparando a intensidade da fluorescência emitida pelo DAF nos grupos sham, 2R1C e 2R1C tratado com sildenafil. B – O gráfico de barras mostra o aumento da produção de NO no rim clipado do animais tratados com sildenafil pelo aumento da intensidade da fluorescência causada pela oxidação do DAF nestes animais, quando comparamos com os animais sham e hipertensos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nosso trabalho mostrou que o tratamento com o inibidor da PDE5, o sildenafil foi capaz de reduzir a PAM e a FC em camundongos com hipertensão renovascular. E os efeitos benéficos do sildenafil incluem a redução da angiotensina II, do estresse oxidativo e danos ao DNA e aumento biodisponibilidade de NO no tecido renal. Em vasos de resistência, o efeito benéfico do sildenafil melhorou o balanço ROS/NO, associado com a melhora na disfunção endotelial vascular periférica.

Nossos resultados de peso corporal foram similares a alguns trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório, em que os animais 2R1C apresentaram redução no peso corporal final (CAMPAGNARO, et al., 2013, NOGUEIRA et al., 2012). Além disso, observamos que os animais tratados com sildenafil apresentaram o peso corporal similar ao grupo sham. Entretanto, há trabalhos que mostram que os animais 2R1C apresentam peso corporal igual ao do grupo sham (ARRUDA et al., 2005; GAVA et al., 2008). Os valores de peso do coração e a razão deste com a tíbia, entretanto apresentaram-se similares entre os grupos sham, 2R1C e 2R1C sildenafil.

Nosso trabalho demonstrou que o sildenafil é promissor como anti-hipertensivo, pois além de reduzir a PAM em 15% e a FC em 8%, foi capaz de reduzir em 50% os níveis teciduais de Ang II do rim clipado, apresentando efeito protetor no rim. Vários estudos tem demonstrado que a inibição da PDE5, pode ser uma opção adequada para redução da PA em situações de hipertensão primária e ainda ter efeitos benéficos na disfunção endotelial (GHIADONI L, VERSARI D, TADDEI S, 2008). Estudos realizados em ratos hipertensos induzidos pela administração de L-NAME em que há uma redução significativa da produção de NO (FERREIRA-MELO, et al., 2006) e em ratos SHR (YAGUAS K, et al., 2010) o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a pressão arterial. O efeito anti-hipertensivo e a prevenção da disfunção endotelial no modelo 2R1C, provavelmente resulta dos efeitos antioxidantes (GUIMARÃES et al., 2013). Stegbauer e cols (2013) reforçam a ideia de que o sildenafil pode ser uma alternativa interessante no tratamento de hipertensão primária ou secundária.

Um dos mecanismos possíveis para a redução da PAM é a diminuição dos níveis teciduais de Ang II que encontra-se aumentada no modelo 2R1C (NAVAR LG,

HARRISON-BERNARD LM., 2000). O aumento deste peptídeo é um potente estímulo para aumento da atividade da NADP(H) oxidase, com consequente aumento na geração de EROs, dentre as principais estão $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 , que são importantes mediadores nas alterações estruturais e funcionais dos vasos na hipertensão (PARAVICINI, TOUYZ, 2006; BELE *et al.*, 2009; ÁLVAREZ Y *et al.*, 2007), e estão significativamente aumentadas em doenças isquêmicas renais (LEGRAND M, *et al.*, 2008; UTTARA B, *et al.*, 2009) e estão associadas com dano ao DNA e apoptose em várias células de animais 2R1C (CAMPAGNARO BP, *et al.*, 2013a, CAMPAGNARO BP, *et al.*, 2013b). Já é demonstrado que o estresse oxidativo é um dos mecanismos mais importantes envolvidos na hipoperfusão renal (WELCH WJ, *et al.*, 2003; CHADE AR, *et al.*, 2004). Estudo recente em nosso laboratório mostrou a relação entre o aumento do estresse oxidativo e, consequente, elevação do dano ao DNA em células da medula óssea de camundongos com hipertensão renovascular (CAMPAGNARO *et al.*, 2013). Portanto, neste contexto, a utilização de estratégias farmacológicas que podem reduzir o estresse oxidativo com capacidade de diminuir a genotoxicidade são extremamente importantes. Dados recentes obtidos em pesquisas realizadas em nosso laboratório e por outros pesquisadores tem demonstrado o potencial do sildenafil em vários modelos experimentais de doenças além do tratamento para disfunção erétil e hipertensão pulmonar (CHOI, *et al.*, 2009; CADIRCI, *et al.*, 2011; BALARINI, *et al.*, 2013; RODRIGUES, *et al.*, 2013)

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório verificaram que o bloqueio da NOS, inibindo a produção de NO, ativa o sistema nervoso simpático com consequente aumento da FC (CUNHA RS, CABRAL AM, VASQUEZ EC, 1993; PEOTTA VA, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS, 2001). Em nosso trabalho observamos que o sildenafil foi capaz de normalizar a FC, provavelmente por aumentar a participação da via NO/GMPc como descrito por Stegbauer e colaboradores, 2013. Considerando a hipótese que o sildenafil pode atravessar a barreira hematoencefálica e a PDE5 encontra-se presente no cérebro, não podemos descartar a possibilidade de que o sildenafil pode ter ação direta no sistema nervoso central, influenciando a atividade simpática e parassimpática. De fato, estudos recentes realizados em ratos com aumento da atividade simpática, os efeitos do sildenafil sobre o sistema cardiovascular, não alteraram a sensibilidade do

barorreflexo. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a influência do tratamento em camundongos (FAZAN, *et al.*, 2008).

A estenose da artéria renal, uma das causas de doença renovascular crônica, e está associada com alterações metabólicas significantes nos rins, desde aumento na síntese de renina e redução da biodisponibilidade do NO e redução do GMPc (STEGBAUER *et al.*, 2013; PEREIRA, *et al.*, 2009), apoptose e atrofia (NOGUEIRA, *et al.*, 2009; KELSEN S, HE X, CHADE AR, 2012). Inicialmente no modelo 2R1C, ocorre ativação do SRA para o desenvolvimento da hipertensão (NOGUEIRA *et al.*, 2012). Avaliações realizadas em outros estudos e em nosso trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre os animais 2R1C e o grupo sham na avaliação da função renal, provavelmente devido a efeitos compensatórios do rim não clipado, que tem a capacidade de aumentar a taxa de filtração glomerular (NOGUEIRA *et al.*, 2012; ZHU XY, *et al.*, 2011). A novidade deste estudo é que o sildenafil pode atuar de duas maneiras nos danos que a hipertensão renovascular pode causar nos rins. Um deles é pela redução dos níveis teciduais de Ang II, que normalmente encontra-se aumentada nos rins (TOKUYAMA H, *et al.*, 2002; PRIETO MC, *et al.*, 2011) e a outra é a preservação da função renal (SCHOOLWERTH AC, *et al.*, 2001; GAROVIC VD, TEXTOR SC, 2005). Esses resultados são controversos quando comparamos com alguns estudos experimentais (ABDI A, JOHNS EJ, 1996; TEXTOR SC, MISRA S, ODERICH GS, 2013; WELCH WJ, *et al.*, 2003) e clínicos de hipertensão renovascular (SCHOOLWERTH AC, *et al.*, 2001; GAROVIC VD, TEXTOR SC, 2005). Pois eles demonstram que o uso de inibidores da ECA ou antagonistas de receptores AT₁ causam prejuízo da função renal, por levarem a uma deterioração aguda da taxa de filtração glomerular (TEXTOR SC, MISRA S, ODERICH GS, 2013; SATTAR, MA *et al.*, 2000).

Em estudos realizados por Welch e colaboradores (2003) mostraram os efeitos anti-hipertensivos de um antioxidante, o tempol, que além de diminuir a PA, diminuiu o estresse oxidativo, a taxa de filtração glomerular e aumentou a eficiência do oxigênio em rim clipado de ratos. Esses autores mostraram que ao contrário do observado quando se utilizaram bloqueadores do receptor de Ang II, como por exemplo o candesartan, obtiveram efeitos antihipertensivos sem causar prejuízo no rim. No modelo de hipertensão 2R1C, alterações na estrutura renal é uma

característica comum, pois a estenose da artéria é capaz de promover atrofia do rim clipado e para efeitos de mecanismo compensatório o rim não clipado sofre hipertrofia (LORENZ *et al.*, 2011; MATAVELLI *et al.*, 2011, NOGUEIRA *et al.*, 2012). A análise da razão entre os pesos do rim esquerdo/rim direito mostrou que nos animais submetidos à estenose da artéria renal ocorre diminuição da massa do rim clipado, e um aumento da massa do rim não clipado. Entretanto, o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a atrofia do rim clipado e ainda atenuar a hipertrofia do rim direito, além disso aumentou a viabilidade das células isoladas do rim clipado.

São diversos os fatores que levam alterações estruturais e funcionais dos órgãos, o excesso na geração de EROs é muito comum nesses casos. Além de diminuir a biodisponibilidade do NO, as EROs podem alterar a funcionalidade de importantes proteínas celulares, mediar a inflamação, proliferação e migração celular, fibrose e aterosclerose. Alterações neurohormonais, que particularmente aumentam a ativação do SRA é comum nos diversos problemas das doenças cardiovasculares. Isso leva a uma redução da capacidade antioxidante dos vasos, coração, cérebro e rins (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001; MONTEZANO; TOUZY, 2012).

Devido à redução significativa do fluxo sanguíneo no rim clipado, a diminuição do oxigênio e o estresse oxidativo causado por essa condição são inevitáveis (KÜÇÜK A., *et al.*, 2012; WAN X., *et al.*, 2013). Assim, o aumento na produção de EROs reduz a biodisponibilidade de NO, por meio da ligação com outros radicais livres ou por descoplamento de NOS, levando a uma menor síntese de NO e aumentando a produção de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 (KELSEN S, HE X, CHADE AR, 2012; PORTO ML., *et al.*, 2011; FÖRSTERMANN U, SESSA WC, 2012; ROE ND, REN J, 2012).

O presente estudo foi primeiro a mensurar a biodisponibilidade de NO em células isoladas de rim clipado, utilizando o DAF-2DA, sendo este método muito específico para determinação dos níveis de NO presente em células isoladas de tecido. Diferentemente, dos níveis plasmáticos (GUIMARÃES, *et al.*, 2013), o NO presente no rim em que foi causada a estenose não estava diferente do grupo sham, isso pode estar ligado a efeitos compensatórios pelo aumento da Ang II intrarenal e pela redução da perfusão sanguínea. Existem estudos que corroboram nossa hipótese, pois mostram um *upregulation* da nNOS em rim de animais 2R1C (

PEREIRA, et al., 2009) e um aumento da atividade da eNOS em modelos de infusão de Ang II (WHITING, et al., 2013). Nosso trabalho demonstrou que o tratamento com sildenafil foi capaz de aumentar 1,7 vezes a biodisponibilidade de NO no rim clipado. O sildenafil, inibidor da PDE5, é uma alternativa terapêutica promissora, uma vez que ele pode prevenir a diminuição da disponibilidade do NO-GMPc e ainda promover um *upregulation* da iNOS e eNOS (CHOI DE, et al., 2009). Embora exerça efeitos protetores em camundongos com deleção das isoformas da NOS (ELROD, GREER, LEFER, 2007). Adicionalmente, o sildenafil aumenta a atividade de enzimas com propriedades antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (RODRIGUES et al., 2013; EBRAHIMI, et al., 2009) e ainda tem a capacidade de restaurar funcionalmente a NOS (HEMNES, ZAIMAN, CHAMPION, 2008), e por isso é considerado um potente vasodilatador (BALARINI *et al.*, 2013; KOUPPARIS, *et al.*, 2005).

Nossos dados são os primeiros a mostrar em camundongos 2R1C, um modelo de hipertensão dependente de Ang II, as ações protetoras do sildenafil não somente por diminuir os mecanismos moleculares que induzem o estresse oxidativo, mas também por outras vias, pois o tratamento foi capaz de promover uma redução significativa dos níveis teciduais de Ang II e com isso contribuir com uma menor sinalização para ativação da via NADP(H) oxidase (CAMPAGNARO, et al., 2012b; VASQUEZ EC, et al., 2012). O sildenafil, além de aumentar os níveis de GMPc, inibe a expressão e atividade da NADP(H) oxidase, o que promove uma diminuição da produção de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 com consequente aumento da biodisponibilidade do NO (BALARINI et al., 2013; KOUPPARIS, et al., 2005). Essas informações também corroboram nossos resultados, pois demonstram a efetividade do sildenafil em aumentar a fluorescência do DAF (diretamente) e diminuir a fluorescência do DHE/DCF (indiretamente) e a pressão arterial. Portanto, as propriedades antioxidantes do sildenafil podem constituir um mecanismo adicional para aumentar a participação do NO em condições de injúria renal.

Outro dado interessante obtivemos quando avaliamos o dano ao DNA pelo ensaio do cometa no rim clipado, como já sabemos ele é um órgão alvo neste modelo de hipertensão e foi possível verificar um aumento da genotoxicidade, provavelmente induzida pelo estresse oxidativo aumentado, gerando uma maior

produção de EROs. No entanto, nossos resultados demonstraram que o sildenafil foi capaz de reduzir os níveis intrarenais de Ang II, conseqüentemente foi capaz de reduzir a produção de $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 nos rins, diminuindo então o estresse oxidativo com conseqüente redução na genotoxicidade, com um mínimo de fragmentação do DNA nos tratados, tendo seus níveis de dano ao DNA comparados ao grupo sham. Esses dados reforçam a ideia de que o sildenafil previne o dano tecidual induzido pelo aumento do estresse oxidativo, como relatado anteriormente por estudo realizado em nosso laboratório (RODRIGUES, *et al.*, 2013) e por outros pesquisadores (JEONG KH, *et al.*, 2009; KIM KH, *et al.*, 2012), abrindo assim a possibilidade de estudos translacionais que investigam a proteção ao DNA em órgãos hipoperfundidos na clínica. Muitos médicos continuam identificando pacientes com perda progressiva da função renal, mesmo após a restauração do fluxo sanguíneo e fornecimento de oxigênio utilizando intervenções terapêuticas como administração de drogas que dissolvem possíveis coágulos ou a inserção de balões usando cateteres (KALYANARAMAN B, 2013; TEXTOR SC, MISRA S, ODERICH GS, 2013, KÜÇÜK A, *et al.*, 2012; MODRALL JG., *et al.*, 2012). Embora, o efeito primário seja vantajoso, tem sido demonstrado que a reoxigenação de tecidos isquêmicos também provoca danos ao tecido ou pode haver injúria causada pela reperfusão, esse fenômeno é conhecido como “paradoxo do oxigênio”. Neste fenômeno, as EROs derivadas da reperfusão são responsáveis pela lesão tecidual pós isquêmica (KALYANARAMAN B, 2013; MCCORD JM, 1985) e essas moléculas podem causar danos a vários componentes celulares, desde DNA, proteínas e lipídeos (TONINI CL., *et al.*, 2013; LEGRAND M, *et al.*, 2008; ZHENG J, *et al.*, 2005), comprometendo a integridade dos rins. Portanto, o sildenafil pode ser uma terapia alternativa para tratamento de doenças renovascular, abrindo possibilidades de uso diferentemente do convencional para pacientes com doenças do trato urogenital envolvendo a cascata NO/GMPc (ÜCKERT S, KUCZYK MA, OELKE M, 2013).

Estudos recentes tem sugerido que a isquemia renal mobiliza rapidamente células progenitoras endoteliais (EPCs), promovendo uma proteção no rins em casos de injúria renal aguda (TEXTOR SC, MISRA S, ODERICH GS, 2013; AICHER A, ZEIHNER AM, DIMMELER S, 2005; ROOKMAAKER MB, *et al.*, 2007; LAVI R, *et al.*, 2010; WU VC, *et al.*, 2013). No entanto, tem sido demonstrado que o efeito pró-oxidante induzido pelo modelo 2R1C é acompanhado por apoptose, principalmente

por células progenitoras, CD34⁺/KDR⁺. Essas células são principalmente recrutadas para participar da reparação renal, o que prejudica a auto-regeneração dos rins (LAVI R, et al., 2010). Além disso, Aleksinskaya e colaboradores (2013), propôs que a hipertensão causa prejuízo na sinalização do NO em células de medula óssea, causando uma inadequada mobilização das células progenitoras. Neste contexto, o sildenafil parece ter um efeito positivo, tem sido relatado recentemente que o sildenafil em doses similares a usada em nosso trabalho aumenta o número de EPCs derivadas de medula óssea em situações em que há aumento do estresse oxidativo (DUSSAULT S, et al., 2009). As EPCs podem estar envolvidas na redução das EROs e apoptose através da terapia celular recentemente observada por nosso grupo de pesquisa (PORTO ML, et al., 2011; LIMA LCF, et al., 2012). No presente estudo, não podemos rejeitar a participação das EPCs promovendo uma melhora da viabilidade celular, reduzindo o dano ao DNA. Portanto, a via do NO/GMPc pode constituir uma via atraente no recrutamento de EPCs, podendo ser um novo local de ação para terapias anti-isquêmicas.

A hipertensão, aterosclerose e o diabetes são doenças associadas com a disfunção vascular. Essa está associada com alteração na função e no tônus do vaso (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; LIU et al., 2013). A Ang II, é um potente ativador da NADP(H) oxidase no sistema cardiovascular, e isso leva um aumento significativo na produção de EROs, que é um dos maiores contribuinte para as doenças vasculares (CLEMPUS; GRIENDLING, 2006; LIU et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2013). No sistema cardiovascular as EROs desempenham um controle fisiológico da função endotelial, do tônus vascular e da função cardíaca. Já em condições fisiopatológicas tem participação na inflamação, na hipertrofia, na proliferação, na apoptose, na migração, na fibrose e na angiogênese, e todos esses processos fazem parte do processo de disfunção endotelial, remodelamento cardiovascular, hipertensão e outras doenças cardiovasculares, conforme podemos observar na ilustração da figura 22. (MONTEZANO; TOUYZ, 2012).

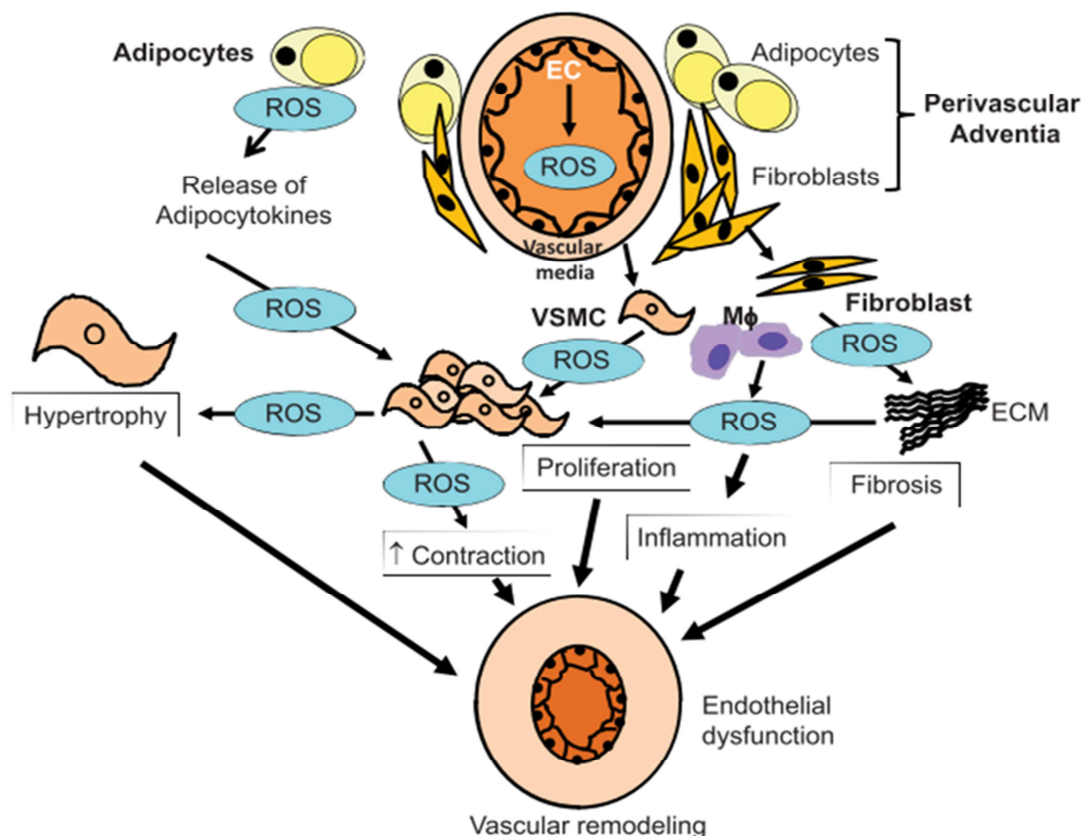


Figura 22: Esquema representativo da influência das EROs alteração da função das células. (MONTEZANO; TOUYZ, 2012).

Desde 1960, há associação entre radicais livres e hipertensão, mas uma investigação mais aprofundada sobre o assunto ocorreu em 1991, em um trabalho que utilizou heparina contendo a superóxido dismutase (SOD) em ratos SHR e verificaram uma redução da pressão sanguínea (NAKAZONO *et al.*, 1991) e em ratos hipertensos por infusão de Ang II houve um aumento na produção de EROs pela NADP(H) oxidase (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013). Estudos recentes em nosso laboratório que avaliaram doenças que induziam o estresse oxidativo demonstraram o efeito antioxidante do sildenafil, prevenindo dano ao DNA do fígado e de células mononucleares (RODRIGUES *et al.*, 2013) e também restaurou a função endotelial de aorta de camundongos ateroscleróticos por diminuir a atividade da NADP(H) oxidase que encontra-se aumentada e por aumentar a biodisponibilidade de NO nesses animais (BALARINI *et al.*, 2013).

Em pesquisa realizada anteriormente em nosso laboratório por Arruda e colaboradores (2005), verificou-se que camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de hipertensão 2R1C apresentaram disfunção vascular no LVM. Os nossos

resultados confirmam os anteriores observando prejuízo no relaxamento dependente do endotélio quando administramos à ACh no grupo 2R1C quando comparados com os animais sham. Dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é um importante fator relaxante de vasos que modula as respostas vasculares quando estimulado por diferentes agonistas. Além disso sabemos que a Ang II é um potente indutor do estresse oxidativo vascular via receptor AT_1 e ainda é capaz de promover *upregulation* da NADP(H) oxidase (SARR *et al.*, 2006), sendo capaz de promover alterações na via do NO em condições de hipertensão. Observamos que parte do prejuízo no relaxamento dos animais 2R1C se dá pela menor biodisponibilidade do NO nestes animais quando comparados com animais do grupo sham, sendo que o tratamento com sildenafil foi capaz de aumentar a participação do NO no relaxamento do LVM de camundongos hipertensos.

Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o desenvolvimento progressivo da hipertensão está associado com o aumento do tônus arteriolar em diferentes leitos vasculares. Alterações funcionais, causadas pela hipertensão em artérias de resistência, podem gerar aumento da resistência periférica, levando ao aumento da contração e a um prejuízo no relaxamento dependente do endotélio. Relata-se que em humanos hipertensos observa-se o aumento da vasoconstrição por aumento do tônus vascular. O comprometimento da função endotelial pode contribuir para uma redução da vasodilatação induzida pela ACh em artérias de resistência de ratos e de humanos. Também demonstra-se que uma diminuição de 13% no diâmetro arteriolar é suficiente para produzir um aumento de aproximadamente 50 mmHg na pressão sanguínea sistêmica. A diminuição do prejuízo da função endotelial das artérias de resistência tem sido alvo das terapias anti-hipertensivas (WANG *et al.*, 2013). Em ratos SHR, em que há uma marcante disfunção endotelial em artérias mesentéricas pelo aumento do estresse oxidativo com consequente aumento na produção de EROs e redução da biodisponibilidade de NO o tratamento com apocinina foi capaz de normalizar o relaxamento dependente do endotélio, e ainda foi capaz de restaurar o relaxamento quando a eNOS foi inibida pela L-NAME, confirmando que as EROs tem uma importante participação na disfunção endotelial observada nestes animais (VIRDIS A, *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo pode interferir na reatividade vascular por diferentes mecanismos. A disfunção endotelial causada pela redução da biodisponibilidade do NO e/ou elevada formação de EROs na parede vascular estão relacionadas ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares (YUNG, et al., 2011; FLEENOR, et al., 2011). Avaliamos a participação das EROs no LVM por meio do bloqueio com apocinina e de fato, observamos que nos animais hipertensos as EROs diminuí de maneira significativa o relaxamento do LVM, pois quando inibimos a produção das EROs o vaso relaxou como o sham. E o sildenafil, como já descrito anteriormente, pode atuar como um antioxidante e os animais tratados não sofrem influência do aumento das EROs no relaxamento do vaso.

Além das EROs, os prostanóides vasoconstritores derivados da ciclooxigenase 1 e 2 são mediadores responsáveis pela disfunção endotelial na hipertensão (FÉLÉTOU M, HUANG Y, AND VANHOUTTE PM, 2011). Estudos tem demonstrado que há um aumento na expressão da COX-2 e da participação de seus derivados na vasoconstrição dependente do endotélio, assim como a resposta vasodilatadora dos vasos em diferentes modelos de hipertensão e também em pacientes hipertensos (ADEAGBO, et al., 2005, ÁLVAREZ, et al., 2005, GARCIA-COHEN et al., 2000, HERNANZ R, et al., 2004 TYAN et al., 2012, VIRDIS, et al., 2009, WENCESLAU et al., 2011, WONG, et al., 2011, WONG, et al., 2010) Em condições fisiológicas, a atividade da COX-1 parece estar envolvida na produção de PGI₂ que possui efeitos vasodilatadores, já na hipertensão a COX-1 sintetiza prostanóides vasoconstritores (VIRDIS, 2007). O aumento da expressão e da atividade da COX-2 em situações de hipertensão normalmente são normalizadas quando é feito tratamento com antagonistas de receptor AT₁ (ÁLVAREZ, et al., 2007), o que confirma o papel da Ang II nos efeitos da hipertensão.

Parece haver uma estreita relação entre EROs e produtos derivados da COX, os mecanismos como isso ocorre ainda não estão bem definidos. Entretanto, sabe-se que EROs pode aumentar a expressão e ou ativação da COX (FENG, et al., 1995, GARCÍA-REDONDO, et al., 2009, KIRISTOSHI, et al., 2003) e tratamentos antioxidantes podem abolir o papel da COX na resposta contrátil dependente do endotélio (WONG SL, et al., 2010). Além disso, a atividade da COX está envolvida na geração de EROs em vasos de ratos SHR (GARCÍA-REDONDO, et al., 2009 ,

TANG, *et al.*, 2007). Sabe-se também que o peroxinitrito produzido pela reação de NO e $\bullet\text{O}_2^-$, principalmente em situações de aumento do estresse oxidativo, diminuem a produção de PGI_2 (ZOU *et al.*, 1997).

Neste estudo avaliamos a participação dos derivados da COX na vasodilatação mediada pela ACh, por meio do bloqueio com L-NAME associado a indometacina, e os nossos dados mostraram que o sildenafil foi capaz de aumentar a participação dos derivados da COX no relaxamento à ACh. Quando comparamos a dAUC (dAUC L-NAME – dAUC L-NAME + indometacina) observamos que nos animais hipertensos havia uma menor participação dos prostanóides derivados do ácido araquidônico quando comparados com o grupo sham, sugerindo a participação desta via no relaxamento à ACh no LVM. Conforme discutido anteriormente o sildenafil pode diminuir a produção de EROS, permitindo um aumento na produção de PGI_2 que possui ação vasodilatadora e pode restaurar a atividade normal da COX-1, promovendo uma melhora da função endotelial.

Está bem estabelecido que as células endoteliais liberam fatores de relaxamento como o NO, as PGI_2 e o EDHF. O reconhecimento de outra via endotelial vasodilatadora que seus mecanismos resultam da ativação de canais K^+ levaram a conceito do fator hiperpolarizante derivado do endotélio ou EDHF. Embora inicialmente pensava-se que era apenas uma substância, agora tornou-se evidente que não é apenas uma única substância. Verificou-se que existem várias moléculas que podem ser consideradas um fator de relaxamento derivado do endotélio, incluindo íons K^+ , metabólicos do ácido araquidônico (ácidos epoxieicosatrienóicos), peróxido de hidrogênio, monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio e o peptídeo natriurético atrial C que são capazes de promover vasodilatação por hiperpolarização e, portanto, o relaxamento do músculo liso vascular, ativando diferentes canais de K^+ . Além disso, há possibilidade de algumas moléculas promoverem relaxamento das células do músculo liso vascular, por aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular pela abertura de canais de K^+ (GILES T, *et al.*, 2012). Estas substâncias geralmente se comportam como agentes vasodilatadores difusíveis ou como segundo mensageiros intracelulares endoteliais (YANG C, *et al.*, 2008; FÉLETOU e VANHOUTTE, 2009). Embora o NO tenha sido considerado como principal mediador do relaxamento dependente do endotélio, neste trabalho

demonstramos que o EDHF pode ser um importante regulador do tônus e da reatividade vascular, especialmente em vasos de resistência, como já descrito por Woodman e colaboradores (2000).

Devemos ressaltar que o calibre do vaso avaliado influencia na resposta mediada pelo EDHF. Em certos vasos sanguíneos, o efluxo de K^+ derivado do endotélio de vasos de pequena e intermediária condutância ativa canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} aumentando a concentração de K^+ no espaço mioendotelial, estimulando canais de K^+ ou Na^+/K^+ ATPase no músculo liso, promovendo então a hiperpolarização e relaxamento do músculo liso vascular (EDWARDS G, *et al.*, 1998; FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM, 2006; YANG C *et al.*, 2008). A Ang II é capaz promover inibição do relaxamento mediado pelo EDHF em artérias mesentéricas (IDRIS KHODJA, *et al.*, 2012; DAL-ROS, *et al.*, 2008). Nossos resultados demonstraram de fato que os animais 2R1C apresentam menor participação do EDHF no relaxamento quando comparado com os animais sham e o tratamento com sildenafil foi capaz de normalizar a participação deste importante vasodilatador em vasos de resistência.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram os efeitos benéficos do sildenafil na hipertensão renovascular. Demonstrando que o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a PAM e a FC, além de diminuir os níveis intrarenais de angiotensina II.

O sildenafil foi capaz de melhorar a função endotelial dos animais hipertensos e os mecanismos envolvidos no benefício da função vascular envolvem a redução do estresse oxidativo e o aumento da biodisponibilidade do NO e uma maior participação das prostaciclina e do EDHF no relaxamento do leito vascular mesentérico.

Nos rins estenóticos o sildenafil foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, diminuindo a produção de EROs, aumentou a biodisponibilidade do NO, favorecendo a uma diminuição da genotoxicidade promovida pela estenose da artéria renal. Neste caso, observamos uma redução dos níveis intra-renais de angiotensina II que é o potente estimulador para os danos observados neste modelo experimental.

Nosso estudo confirma o sildenafil é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da hipertensão secundária e de suas consequências, no entanto mais pesquisas são necessárias para avaliar os benefícios do seu uso em pacientes.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ABDI A, JOHNS EJ: Importance of the renin-angiotensin system in the generation of kidney failure in renovascular hypertension. **J Hypertens.**, v.14 , p. 1131-7, 1996.

ADEAGBO AS, et al. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt- induced hypertension. **J Hypertens.**, v. 23: p. 1025–1036, 2005.

AICHER A, ZEIHNER AM, DIMMELER S: Mobilizing endothelial progenitor cells. **Hypertension**, v. 45, p. 321-325, 2005.

AIRES M.M., et al., Fisiologia. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ÁLVAREZ Y. et al. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **J Hypertens**, v. 23, p. 767–777, 2005.

ÁLVAREZ Y. et al. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2- derived products in vascular responses of hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther** , v.321, p. 381–388, 2007.

ARRUDA R.M.P. et al. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 46, p. 932-936, Oct, 2005.

AVERSA A. et al. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. **Diabet Med**, v. 25, p. 37-44, Jan. 2008.

BALARINI C.M. et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **J Transl Med. Journal of Translational Medicine**, v. 11, p. 3, Jan. 2013.

BELE A. et al. Hypertension Increases Contractile Responses to Hydrogen Peroxide in Resistance Arteries through Increased Thromboxane A₂ , Ca²⁺, and Superoxide

Anion Levels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 1, p 19-27, 2009.

DAL-ROS S. et al. Angiotensin II-Induced Hypertension Is Associated with a Selective Inhibition of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in the Rat Mesenteric Artery. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n.2, p. 478–86, Out, 2008.

CADIRCI E. et al. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. **Clin Exp Immunol**, v. 166, n. 3, p 374-384, 2011.

CAMPAGNARO B.P, et al. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. **DNA Cell Biol**, v. 32, n.8, p. 458-466, 2013.

CAMPAGNARO B.P. et al. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from Angiotensin-dependent hypertensive mice. **Int J Hypertens**, v. 2013, p. 10, Jan. 2013..

CAMPAGNARO B.P. et al. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular Angiotensin-dependent hypertensive mouse. **Int J Hypertens**. v. 2012, p.9, Jan. 2012.

CAMPAGNARO BP. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células hematopoiéticas e endoteliais de camundongos. Tese de Doutorado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2012.

CHADE A.R. et al. Antioxidant intervention blunts renal injury in experimental renovascular disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 4, p. 958-966, 2004.

CHOI D.E. et al. Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 297, n. 2, p. 362-370, 2009.

CLEMPUS R.E., Griending K.K. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res**, v. 71, n. 2, p. 216-225, Jul. 2006.

CUNHA R.S., CABRAL A.M., VASQUEZ E.C.: Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. **Am J Hypertens**, v. 6, n. 9, p. 806-809, 1993.

DUSSAULT S. et al. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E deficient mice. **Hypertension**, v. 54, p. 1043-1049, 2009.

EDWARDS G. et al. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, p. 269-272, 1998.

FAZAN R. JR. et al. Sildenafil acts on the central nervous system increasing sympathetic activity. **J Appl Physiol** (1985)., v. 104, n. 6, p. 1683-9, 2008.

FÉLÉTOU M., VANHOUTTE P.M. EDHF: na update. **Clin Sci.**, v. 117, p. 139-155, 2009.

FÉLÉTOU M., VANHOUTTE P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 26, p. 1215-25, 2006.

FÉLÉTOU M., HUANG Y., VANHOUTTE P.M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **Br J Pharmacol.**, v. 164, p. 894–912, 2011.

FENG L., et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide. **J Clin Invest.** v. 95, p. 1669– 1675, 1995.

GARCIA-COHEN E.C. et al. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 293, p. 75–81, 2000.

GARCÍA-REDONDO A.B. et al. Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. **J Hypertens.**, v. 27, p. 1814–1822, 2009.

GARCÍA-REDONDO A.B. et al. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 328, p. 19–27, 2009.

GHIADONI L., VERSARI D., TADDEI S. Phosphodiesterase 5 inhibition in essential hypertension. **Curr Hypertens Rep.**, v.10, n.1, p.52-57, 2008..

GILES T.D. et al. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. **J Clin Hypertens (Greenwich)**. V. 14, n. 4, p. 198-205, Apr., 2012.

GRIENDLING K.K., SORESCU D., USHIO-FUKAI M. NAD(P)H Oxidase : Role in Cardiovascular Biology and Disease. **Circ Res.**, v. 86, n. 5, p. 494-501, Mar, 2000.

GUIMARÃES D.A. et al. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. **Redox Biol.** v. 1, n. 1, p. 578-85, Jan., 2013.

HERNANZ R. et al. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, p.225– 234, 2004.

HIYOSHI H. et al. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. **Hypertension**, v. 45, n.5, p. 967-73, May, 2005.

IDRIS KHODJA N. et al. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. **PLoS One**, v. 7, n. 2, Jan., 2012.

INTENGAN H.D., SCHIFFRIN E.L. Vascular Remodeling In Hypertension: Roles Of Apoptosis, Inflammation, And Fibrosis. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 581–587, 2001.

JEONG K.H. et al. Effects of sildenafil on oxidative and inflammatory injuries of the kidney in streptozotocininduced diabetic rats. **Am J Nephrol.**, v. 29, n. 3, p. 274-282, 2009.

KELSEN S., HE X., CHADE A.R.: Early superoxide scavenging accelerates renal microvascular rarefaction and damage in the stenotic kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.303, n. 4, p. 576-583, 2012.

KALYANARAMAN B: Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol**, v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013.

KHANGURA K.K. et al. Cardiac Function In Renovascular Hypertensive Patients With and Without Renal Dysfunction. **Am J Hypertens**, p. 1-9, Oct, 2013.

KIM K.H. et al. Long-term effects of sildenafil in a rat model of chronic mitral regurgitation: benefits of ventricular remodeling and exercise capacity. **Circulation**, v. 125, n. 11, p. 1390-1401, 2012.

K. YAGUAS, et al. Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension, **Am. J. Nephrol**, v. 31, p. 283-291, 2010. 31 (2010) 283–291.

KIRITOSHI S. et al. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 52, p. 2570-2577, 2003.

KLIMA Ł. et al. Structure and function of large arteries in hypertension in relation to oxidative stress markers. **Kardiol Pol**. v. 71, n. 9, p. 917-923, Jan, 2013.

KOUPPARIS A.J. et al. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. **BJU Int**, v. 96, n. 3, p. 423-427, 2005.

KÜÇÜK A. et al. The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 10, p. 9775-9782, 2012.

LAVI R. et al. Simvastatin decreases endothelial progenitor cell apoptosis in the kidney of hypertensive hypercholesterolemic pigs. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, p. 976-983, 2010.

LEGRAND M. et al. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. **Mol Med**, v. 14, p. 502-516, 2008.

LERMAN L.O. et al. Animal models of hypertension: an overview. **J Lab Clin Med**, v. 146, n. 3, p. 160-173, Sep, 2005.

LEWINGTON S. et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **The Lancet**, v. 360, n. 9349 p. 1903-1913, Dec, 2002.

LIU C-C., et al. Oxidative inhibition of the vascular Na(+)-K(+) pump via NADPH oxidase-dependent β 1-subunit glutathionylation: Implications for angiotensin II-induced vascular dysfunction. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 563-572, Dec, 2013

LUZ P.L., LAURINDO F.R.M., CHAGAS A.C.P. Endotélio e Doenças Cardiovasculares. 1ed.São Paulo: Atheneu; 2005.

LORENZ J.N., et al. Renovascular hypertension using a modified two-kidney, one-clip approach in mice is not dependent on the α 1 or α 2 Na-K-ATPase ouabain-binding site. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.301, n. 3, p. 615-621, 2011.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18, n. 1, p. 51-65, 2013.

MATAVELLI LC., HUANG J., SIRAGY HM. Angiotensin AT2 receptor stimulations inhibits Early Renal Inflammation in renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 308-313, Feb., 2011.

MCCORD J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N Engl J Med**, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.

MEYRELLES S.S. et al. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids Health Dis**, v. 10, n. 1, p. 211, Jan, 2011.

MILANI E., et al. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 140, n. 2, p. 251-255, Feb, 2005.

MILLER M.R., MEGSON I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **Br J Pharmacol**, v.151, n. 3, p. 305-321, Jun, 2007.

MITCHELL, J.A. et al. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 1, p. 141-147, 2008.

MODRALL J.G. et al. Assessing outcomes to determine whether symptoms related to hypertension justify renal artery stenting. **J Vasc Surg**, v. 55, n. 2, p. 413-419, 2012.

MOLINA, MCB. Hipertensão arterial e fatores nutricionais: um estudo de base populacional no município de Vitória/ES [Tese de Doutorado]. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo; 2002.

MONTEZANO A.C., TOUYZ R.M. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. **Can J Cardiol**, v. 28, n. 3, p. 288-295, May, 2012.

NAKAZONO K. et al. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 22, p. 10045-10048, Nov, 1991.

NAVAR L.G. et al. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. **News Physiol Sci**, v. 13, p. 170-176, Aug,1998.

NAVAR L.G., HARRISON-BERNAD L.M. Intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II dependent hypertension. **Hypertension Res**. v. 23, n. 4, March, 2000.

NAVAR L.G. et al. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. **Hypertension**, v. 39, p.316-322, Feb, 2002.

NOGUEIRA, BRENO VALENTIM. Efeitos do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) sobre a hipertensão renovascular em camundongos. Tese de

Doutorado – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2008.

NOGUEIRA B.V. et al. Cellular Physiology and Biochemistry y Biochemistry Granulocyte Colony Stimulating Factor Prevents Kidney Infarction and Attenuates Renovascular Hypertension. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 29, p. 143-152, 2012.

PARAVICINI T.M., TOUYZ R.M. Redox signaling in hypertension. **Cardiovasc Res**, v.71, n. 2, p. 247–258, Jul, 2006.

PATIL C.S., SINGH V.P., KULKARNI S.K. Modulatory effect of sildenafil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. **Pharmacol Rep**, v. 58, n. 3, p. 373–380, 2006.

PEOTTA V.A., VASQUEZ E.C., MEYRELLES S.S. Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. **Hypertension**, v. 38, p.555-559, 2001.

PORTO, M.L. et al. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.155, jan. 2011.

PRIETO M.C. et al. Reciprocal changes in renal ACE/ANG II and ACE2/ANG 1-7 are associated with enhanced collecting duct renin in Goldblatt hypertensive rats. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 300, n. 3, p. 749-755, 2011.

RAJAGOPALAN S. et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest.**, v. 97, n.8, p. 1916-1923, Apr., 1996.

RODRIGUES, BP. Efeito do sildenafil na genotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em camundongos ateroscleróticos. Dissertação de mestrado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2013.

RODRIGUES B.P. et al. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n.1, p.128, Jan., 2013.

ROOKMAAKER M.B. et al. Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.293, p. 624-630, 2007.

ROSCIONI S.S, HEERSPINK H.J.L., DE ZEEUW D. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol**. Nature Publishing Group; Dec, 2013.

RUIZ-ORTEGA M. et al. Role of the Renin-Angiotensin System in Vascular Diseases: Expanding the Field. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1382-1387, Dec., 2001.

SADJADI J. et al. Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism. **J Surg Res**. v. 129, n. 2, p. 271-277, Dec., 2005.

SARR, M. et al. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research**, v. 71, n.4, p. 794–802. May , 2006.

SAYER G., BHAT G. The Renin-Angiotensin-aldosterone system and heart failure. **Cardiol Clin**. Elsevier Inc; v. 32, n.1, p. 21-32, Feb., 2014.

FERREIRA-MELO S.E. et al. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats, **Eur. J. Pharmacol**. v. 542, p. 141-147, 2006.

STEGBAUER J. et al. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. **PLoS One**, v. 8, n.11, Jan., 2013.

TANG E.H. et al. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **Br J Pharmacol**, v. 151, p. 15–23, 2007.

TEXTOR S.C., MISRA S., ODERICH G.S. Percutaneous revascularization for ischemic nephropathy: the past, present, and future. **Kidney Int.**, v. 83, n. 1, p. 28-40, 2013.

TIAN X.Y. et al. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2a) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, p. 363–373, 2012.

TOKUYAMA H. et al. Differential regulation of elevated renal angiotensin II in chronic renal ischemia. **Hypertension**, v. 40, n. 1, p. 34-40, 2002.

TONINI C.L. et al. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 3325-42, Feb, 2013.

ÜCKERT S., KUCZYK M.A., OELKE M. Phosphodiesterase inhibition in clinical urology. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 6, n.3, p. 323-332, 2013.

UTTARA B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol.**, v. 7, n.1, p. 65-74, 2009.

VALLOTTON M.B. et al. Interaction of vasopressin and angiotensin II in stimulation of prostacyclin synthesis in vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 257, n.5, p. 617-624, Nov., 1989.

VERAS R.C. et al. Participation of nitric oxide pathway in the relaxation response induced by E-cinnamaldehyde oxime in superior mesenteric artery isolated from rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 62, n. 1., p. 58-66, Jul., 2013.

VIRDIS A. et al. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. **Hypertension**, v. 53, p. 1008–1016, 2009.

WANG Y., ZHANG M.S., LIU Y. Nebivolol treatment improves resistant arterial function and reduces ventricular hypertrophy and angiotensin II in spontaneously

hypertension rats. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 14, n. 2, p. 146-55, Jun., 2013.

WENCESLAU C.F. et al. Long- term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. **J Vasc Res.**, v. 48, p. 316–326, 2011.

WELCH W.J. et al. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K1C kidney. **Hypertension**, v. 41, p 692-696, 2003.

WILLIAMS, B. The year in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 18, p. 1803–17. March, 2008.

WONG S.L. et al. Pivotal role of protein kinase C delta in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 31, p. 1169–1976, 2011.

WONG W.T. et al. Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. **Circ Res.**, v. 107, p. 984– 991, 2010.

WONG S.L. et al. Prostaglandins in action indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions. **Adv Pharmacol.**, v. 60, p. 61–83, 2010.

WOODMAN O.L., WONGSAWATKUL O., SOBEY C.G. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K⁺ channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 27, p. 34-40, 2000.

WU V.C. et al. In acute kidney injury, indoxyl sulfate impairs human endothelial progenitor cells: modulation by statin. **Angiogenesis**, v. 16, n. 3, p. 609-624, 2013.

YANG, C. et al. Inhibitory effects of epoxyeicosatrienoic acids on volume-activated chloride channels in rat mesenteric arterial smooth muscle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.87, p. 62–7. Aug, 2008.

ZHANG, Y. et al. Apolipoprotein B of low-density lipoprotein impairs nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric arteries. **European Journal of Pharmacology**, Jan, 2014.

ZHENG J. et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 288, n. 2, p.387–398, 2005.

ZHUO, J. L. et al. New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system : a critical review of classical and new paradigms. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p.1–14, Nov., 2013.

ZOU M., Martin C., Ullrich V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. **Biol Chem.**, v. 378, p.707–713, 1997.

Publicação Resultante Deste Trabalho

Journal of Translational Medicine

Fator de impacto 3,47

Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension

Ananda T Dias, Bianca P Rodrigues, Marcella L Porto, Ágata L Gava, Camille M Balarini, Flavia P S Freitas, Zaira Palomino, Dulce E Casarini, Bianca P Campagnaro, Thiago M C Pereira, Silvana S Meyrelles, Elisardo C Vasquez.

J Transl Med. 2014 Feb 6; 12:35.

doi: 10.1186/1479-5876-12-35.